



ADAM30 et métabolisme de l'APP : implication dans le développement physiopathologique de la maladie d'Alzheimer

Florent Letronne

► To cite this version:

Florent Letronne. ADAM30 et métabolisme de l'APP : implication dans le développement physiopathologique de la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S062 . tel-01230683

HAL Id: tel-01230683

<https://theses.hal.science/tel-01230683>

Submitted on 18 Nov 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE2

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

En Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Neurosciences

ADAM30 et métabolisme de l'APP

Implication dans le développement physiopathologique de la maladie d'Alzheimer ?

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2014 par

Florent LETRONNE

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel

Président

Madame le Docteur Bernadette Allinquant

Directeur du laboratoire

Madame le Docteur Marie-Claude Potier

Rapporteur

Monsieur le Docteur David Blum

Rapporteur

Monsieur le Docteur Marc Dhenain

Examineur

Monsieur le Docteur Jean-Charles Lambert

Examineur

Directeur de thèse

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE2

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

En Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Neurosciences

ADAM30 et métabolisme de l'APP

Implication dans le développement physiopathologique
de la maladie d'Alzheimer ?

Soutenue publiquement le 17 Décembre 2014 par

Florent LETRONNE

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Bernadette Allinquant	Rapporteur
Madame le Docteur Marie-Claude Potier	Rapporteur
Monsieur le Docteur David Blum	Examineur
Monsieur le Docteur Marc Dhenain	Examineur
Monsieur le Docteur Jean-Charles Lambert	Directeur de thèse
Monsieur le Professeur Philippe Amouyel	Directeur du laboratoire

Unité INSERM U744 – Institut Pasteur de Lille

**A mes amis,
A ma famille,
A ma plaisanterelle.**

Avant toute chose je tiens à présenter mes plus sincères remerciements à tous les membres de mon jury de thèse :

A vous Monsieur le Professeur Philippe Amouyel pour m'avoir accepté au sein de votre laboratoire. Avoir travaillé dans votre laboratoire de l'Institut Pasteur de Lille et participé à la recherche contre la maladie d'Alzheimer est pour moi une véritable fierté. Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour toute l'attention et le soutien que vous m'avez porté quand ce fut nécessaire.

A vous Monsieur le Docteur Jean-Charles Lambert, travailler dans votre équipe fut une expérience des plus enrichissantes, tant sur le plan scientifique que professionnel. Merci infiniment de m'avoir permis de travailler sur un sujet de recherche tel qu'ADAM30 et le métabolisme de l'APP. Je suis particulièrement heureux d'avoir pu travailler sur le modèle de souris triple transgéniques : la biologie animale est devenue pour moi une véritable passion. Et merci beaucoup pour m'avoir accordé la chance de présenter mes travaux dans deux AAIC dont celui de Boston. Bien évidemment je vous remercie pour tout votre travail de relecture et de correction de ma thèse ainsi que pour vos conseils et remarques pour mon oral.

A vous Madame le Docteur Bernadette Allinquant, d'avoir accepté d'être rapportrice de mon manuscrit et jury de thèse. Vous avez pu suivre l'évolution de mes travaux de thèse en ayant accepté d'être par deux fois membre de mon comité de suivi de thèse ce dont je vous suis très reconnaissant. Je vous remercie profondément pour votre aide, votre soutien et votre correction de mon manuscrit de thèse.

A vous Madame le Docteur Marie-Claude Potier, pour tout l'intérêt que vous avez eu pour ce travail et toutes les corrections et suggestions que vous lui avez apporté. Je suis honoré que vous ayez accepté d'être ma rapportrice de thèse et d'être membre de mon jury de thèse.

A vous Monsieur le Docteur David Blum, qui avez suivi ces travaux depuis mon Master II puis lors de mes deux comités de suivi de thèse. Je vous remercie du soutien et des idées que vous avez apporté durant ces comités. Merci encore pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, je suis heureux de vous montrer enfin la totalité de ces travaux.

A vous Monsieur le Docteur Marc Dhenain, d'avoir accepté d'assister et de commenter cette thèse. Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de mon jury, c'est une façon pour moi de vous remercier pour l'exceptionnel travail que vous avez fait sur les cerveaux de souris en 3D et de vous présenter enfin tous les travaux effectués que je vous avais résumé lors de l'AAIC à Boston (où le homard était très bon !).

Je souhaite également profondément remercier la Fondation pour la Recherche Médicale pour avoir porté un grand intérêt à ce projet et d'avoir financé ma 4^e année de thèse.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe neuro qu'ils soient présents ou partis vers de nouvelles aventures, qu'ils m'aient aidé dans ce travail ou tout simplement soutenu tout au long de cette thèse : Anne-Marie, Amandine, Florie, Cloé, Charlotte, Céline, Valérie, Anaïs, Harmony, Armelle, Fancy, ainsi que Julien, Yoann, Nicolas, Alexis, Pierre, Vincent, Benjamin, Franck et Geoffroy. Merci à vous qui avez tous contribué directement ou indirectement à ce travail par votre aide, vos conseils, votre soutien, votre énergie.

Mention spéciale à Anne-Marie Ayral qui a réussi (on ne sait trop comment) à me supporter pendant ces 5 longues années. Merci d'avoir partagé avec moi tous ces travaux sur nos petites démons noires aux grandes oreilles et aux yeux vifs. Merci de m'avoir formé à l'expérimentation animale et pour tous tes conseils avisés (bien que lourdement tarifés à coup de « chat bleu »), ton aide précieuse, ton soutien continu et ces grandes discussions animées à l'animalerie. Travailler avec toi m'a définitivement convaincu que la biologie animale est mon dada. Merci !

Bien entendu je souhaite remercier toute l'unité U744 pour votre accueil, vos conseils et votre sympathie.

Un grand merci aux Docteurs Florence Pinet, Aline Meirhaeghe, Julie Dumont, Louisa Goumidi et Jean Dallongeville pour toute votre aide lors de mes présentations orales y compris la préparation de mon oral de Master II. Vos conseils et votre soutien m'ont été très importants.

Anne-Sophie, Claire et Chantal, merci infiniment à vous pour toute l'aide logistique et administrative dont j'ai eu besoin durant ces 5 années passées au laboratoire et surtout pour votre soutien moral !

Bien entendu je n'oublie pas Xavier qui a relu ce manuscrit de thèse avec tant d'attention pour dénicher les fautes. J'espère ne pas t'avoir rendu aveugle. Merci aussi pour ta sympathie et tes conseils !!

J'en viens à remercier maintenant les amis, les collègues, les camarades, la joyeuse troupe du midi:

Merci Annie pour ta gentillesse et tes conseils, Gilles pour ton humour ~~toujours~~ percutant et Marie pour ta sympathie et tes petits gâteaux (et merci pour le dessin !).

Merci à notre reine des mouches, Cloé ou Kroé, pour ta bonne humeur constante et ta coolitude. J'espère que tu auras bientôt ton poste !

Merci Marion pour toutes nos discussions enflammées et ton trop plein d'énergie (Miss tornade). Tu es la prochaine sur la liste et je te souhaite tout le meilleur pour la fin de ta thèse (courage tiens bon !!) !!

Merci Yoann pour tous ces moments de franche rigolade, ces discussions de geek, tes conseils avisés, ton soutien et la relecture de mon manuscrit. Merci à Aude aussi pour ta gentillesse et ton soutien. Prenez bien soin de votre bout' choux !

Merci encore toute petite demi Floww, notre volleyeuse nationale, pour tout ce travail acharné que tu as fourni sur la partie biologie cellulaire d'ADAM30. Entretiens bien ton petit autel dans ton bureau (bwaaaaah !)

Oh toi vénérable du sommet, antique parmi les antiques, merci de m'avoir accordé ton amitié. Merci pour tes légendaires éjections de lunettes, ton répertoire 90's, ces soirées endiablées et tous tes conseils de doyenne. N'oublions pas ton zigoto de mari pour son amitié, son aide et ses conseils !! J'espère que vous aurez rapidement votre maison !

Merci Tata la redoutable ! Merci pour ces soirées, ces weekends au sun/centerpark. Merci pour toute ~~ta méchanceté et ta violence~~ ta gentillesse et ton soutien. Evidemment merci pour tes informations documentaires toujours avisées. Et encore toutes mes félicitations pour ta nouvelle maison !!

Merci The American Moumou, pour tous ces moments où la raison à basculée définitivement dans la folie, ta décadence (tu me remercieras plus tard, de là bas tu ne peux pas me taper), ta gourmandise et tes gaffes toujours très drôles. Et merci pour ton aide et ton soutien transatlantique !!

Merci Barbichette pour tous ces délires et ces karaokés improvisés et un énorme merci pour ton précieux soutien surtout ces derniers mois. Merci pour toutes ces parties de Mario Kart, de diablo 3, de pathfinder... cette sportivité à Keep Cool (suivi d'un Mcdo et d'une bière of course) et ton accent de parisienne (mouahaha !). Par contre tu peux te broser pour les kinders...^^

Domo arigato Raziel san, The coloc, pour absolument tout ! Ton soutien, ton aide, tes traductions, toutes nos soirées, cinés, jeux vidéos, magic, pathfinder...Tous ces moments d'éclate totale à l'appart, au Japon, au ski, à la Japan Expo...Tous ces jeux de mots aussi vaseux que les miens (quoi que je tiens la palme), ces costumes improvisés, les scavengers... On continuera en postdoc !!

Enfin je termine mes remerciements en n'oubliant surtout pas toute ma famille. Merci Maman pour ton amour, tes conseils et d'avoir toujours cru en moi, merci Papa et Olivier pour votre affection et vos encouragements. Merci à tous les autres, les anciens comme les nouveaux, tous mes cousins, la vieille tante, Leon, Tata martine... vous avez été un soutien important pour moi. J'aurais aimé que certain soit encore là pour voir ma thèse mais je suis heureux d'avoir enfin pu tenir ma promesse. On fêtera ça dignement comme d'habitude, je vous fais confiance là-dessus !!

Merci à tous !!

- Résumé -

L'accumulation cérébrale progressive de peptides amyloïdes (A β) générés à partir du clivage du précurseur du peptide amyloïde (APP) par les sécrétases (β et γ) est un mécanisme central de la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi, améliorer la compréhension de la régulation et de l'homéostasie du métabolisme de l'APP est devenu primordial. Partant de ce constat, nous avons supposé qu'une partie de la réponse pourrait être apportée par la caractérisation de nouveaux acteurs du métabolisme de l'APP. De part leurs rôles cruciaux dans le cerveau (développement, plasticité et réparations) et dans le métabolisme de l'APP (α -sécrétases), les ADAMs sont des protéines d'intérêt dont certaines fonctions ou rôles restent à déterminer.

Précédemment, par une approche transcriptomique ciblant la famille des ADAMs dans des cerveaux de patients et de contrôles, ADAM30 a été retrouvée sous-exprimée dans le cerveau des patients atteints de la pathologie. Dans deux modèles cellulaires nous avons constaté que la sous-expression d'ADAM30 entraînait une augmentation de tous les produits du métabolisme de l'APP comme chez les patients. Le résultat opposé a été obtenu lors de la sur-expression d'ADAM30 dans ces cellules.

Pour tenter de répliquer ces résultats dans un modèle plus proche de la physiopathologie humaine, nous avons développé un modèle de souris triples transgéniques surexprimant l'APP^{SweInd} et ADAM30 de manière conditionnelle. Dans ce modèle nous avons observé et mesuré une diminution des dépôts amyloïdes dans le cerveau des souris exprimant ADAM30. Dans un second temps puisqu'il avait été montré au laboratoire qu'ADAM30 ne module pas l'activité des sécrétases et ne clive pas directement l'APP, nous avons cherché à déterminer les substrats d'ADAM30 dans le cadre du métabolisme de l'APP. Par une approche systématique nous avons pu déterminer que la Cathepsine D (CTSD) et l'Insuline Receptor Substrat 4 (IRS4) sont deux substrats potentiels d'ADAM30. Dans nos modèles cellulaires et de souris, nous avons pu constater qu'ADAM30 est capable de cliver et d'activer la CTSD. L'activité de la CTSD semble nécessaire pour l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP. Nous avons pu déterminer que l'action spécifique d'ADAM30 pour la CTSD est dépendante de la séquence d'adressage au lysosome

située dans l'extrémité C-terminale de l'APP. Comme la CTSD est une protéine Lysosomale, ADAM30 pourrait favoriser spécifiquement l'activation de la CTSD augmentant ainsi la dégradation de l'APP au sein de la voie endosome/lysosome. Ce mécanisme limiterait l'entrée de l'APP dans son métabolisme et donc la production de peptides amyloïdes. Afin de mieux comprendre la spécificité d'action d'ADAM30 pour la CTSD et l'APP, nous avons commencé à travailler sur le rôle potentiel d'IRS4 et la relation entre la voie de signalisation de l'Insuline et le métabolisme de l'APP.

Nos travaux nous ont donc permis de mettre en évidence un nouvel acteur du métabolisme de l'APP, ADAM30, intervenant dans la régulation et la dégradation de ce dernier et ainsi d'améliorer notre compréhension des mécanismes de régulations fins impliqués dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer.

Mots clés

Maladie d'Alzheimer, métabolisme de l'APP, peptide amyloïde, homéostasie, ADAM30, CTSD, IRS4, voie endosome/lysosome, modèles cellulaires, souris triples transgéniques

- Abstract -

Progressive intra-cerebral accumulation of amyloid peptides (A β) formed after sequential cleavage of the amyloid peptide precursor (APP) by secretases (β and γ), is a central mechanism for Alzheimer's disease. Therefore, a better understanding of APP regulation and homeostasis is now crucial. With this background, we postulate that the characterization of new actors in the APP metabolism could provide a more subtle understanding of this APP metabolism and trafficking. From their obvious implication in brain (development, plasticity and repair) and in APP metabolism (α -secretases), ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) are an important protein proteins family which still have some undetermined function or role.

Previously, a transcriptomic approach targeting ADAMs family has been done at the laboratory on Alzheimer's patient or control brains and found ADAM30 as under-expressed in Alzheimer's patient brains. On cellular models, we confirmed that ADAM30 under-expression was associate with an increase in production/secretion of all the APP metabolim byproducts. Opposite results were found with ADAM30 over-expression.

To replicate those results in another model closest to human pathophysiology, we have developed a triple transgenic mice model over-expressing APP^{SweInd} and conditionally over-expressing ADAM30. In this model, we have observed and measured a decrease in amyloid deposits in mice brains over-expressing ADAM30. Secondly, because ADAM30 did not modulate secretase activities and did not cleave APP directly, we decided to determine ADAM30 substrats in the APP metabolism context. With a systematic approach, we have determined that Cathepsin D (CTSD) and Insulin Receptor Substrat 4 (IRS4) are two ADAM30 potential substrats. In our cellular models, we have found that ADAM30 is able to cleave and activate CTSD. This CTSD activity is required for ADAM30 action on APP metabolism. We have determined that ADAM30 specific action for CTSD is dependent on lysosome adresssing sequence localised in APP C-terminal part. CTSD is a lysosomal protein and so ADAM30 would make CTSD specific activation easier. This mecanism would be able to increase APP degradation in endosome/lysosome pathway and reduce APP entry in its metabolism. To better understand ADAM30 specific action on CTSD

and APP, we begin to investigate the potential role of IRS4 and the relation between insulin signaling pathway and APP metabolism.

Combined together, those data suggest that ADAM30 is a new APP metabolism actor, involved in an early APP regulation and degradation pathway dependent on lysosome activation. This study participate in a better understanding of the fine mechanism regulations involved in Alzheimer's disease pathophysiological process.

Key words

Alzheimer's disease, APP metabolism, amyloid peptide, homeostasy, ADAM30, CTSD, IRS4, endosomal/lysosomal pathway, cellular models, triple transgenic mice model

Publications et communications

- Articles-

Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating Tau Pathology

Mol Psychiatry. 2013 Nov;18(11):1225-34. Epub 2013 Feb 12

Julien Chapuis, Franck Hansmannel, Marc Gistelinck, Anaïs Mounier, Caroline Van Cauwenberghe, Kristof Van Kolen, Fancy Geller, Yoann Sottejeau, Denise Harold, Pierre Dourlen, Benjamin Grenier-Boley, Yoichiro Kamatani, Benoit Delepine, Florie Demiautte, Diana Zelenika, Nadège Zommer, Malika Hamdane, Céline Bellenguez, Jean-François Dartigues, Jean-Jacques Hauw, **Florent Letronne**, Anne-Marie Ayrat, Kristel Slegers, Ann Schellens, Lies Vanden Broeck, Sebastiaan Engelborghs, Peter Paul De deyn, Rik Vandenbergh, Michael O'Donovan, Michael Owen, Jacques Epelbaum, Marc Mercken, Erik Karran, M Bantscheff, G Drewes, G Joberty, Dominique Campion, Jean-Noel Octave, Claudine Berr, Marc Lathrop, Patrick Callaerts, David Mann, Julie Williams, Luc Buée, Ilse Dewachter, Christine Van Broeckhoven, Philippe Amouyel, Diederik Moechars, Bart Dermaut, Jean-Charles Lambert ; GERAD consortium

Unrevealed APP metabolism : ADAM30 decreases amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways through CTSD lysosomal activation

En soumission

Florent Letronne, Geoffroy Laumet, Anne-Marie Ayrat, Julien Chapuis, Florie Demiautte, Mathias Laga, Michel Vanderberghe, Nicolas malmanche, Florence Leroux, Yoann Sottejeau, Linda Chami, Pierre Dourlen, Charlotte Bauer, Ludovic Huot, Elisabeth Werkmeister, Franck Hansmannel, Julie Dumont, Alexis Bretteville, Charlotte Delay, Bart Dermaut, Benoit Deprez, Anne-Sophie Hérard, Marc Dhenain, Nicolas Souedet, Florence Pasquier, Claudine Berr, Jean-Jacques Hauw, Yves Lemoine, Luc Buée, David Mann, Rebecca Déprez, Philippe Amouyel, Frédéric Checler, David Hot, Thierry Delzescaux, Kris Gevaert, Jean-Charles Lambert

- Posters-

Alzheimer's Association International Conference (AAIC) Paris Juillet 2011 :

Characterisation of a new ADAM as a key player of the APP metabolism

Florent Letronne, Geoffroy Laumet, Florie Demiautte, Anne-Marie Ayrat, David Hot, Franck Hansmannel, Anaïs Mounier, Claudine Berr, Ludovic Huot, Florence Combe, Faiza Bensemain, Frédéric Checler, Florence Pasquier, Jean-Jacques Hauw, Yves Lemoine, Luc Buée, David Mann, Philippe Amouyel, Jean-Charles Lambert

Involvement of IL-33 in Alzheimer's disease

Anaïs Mounier, Renaud Blervaque, Ludovic Huot, Stéphanie Slupek, Julien Chapuis, Anne-Marie Ayrat, **Florent Letronne**, Frank Hansmannel, Yves Lemoine, Philippe Amouyel, David Hot, Jean-Charles Lambert

Assessment of Bin1 involvement in the AD pathophysiological process

Franck Hansmannel, Anaïs Mounier, Marc Gistelinck, Benjamin Grenier-Boley, Marie-Eve Maturski, **Florent Letronne**, Anne-Marie Ayrat, Frederic Checler, Luc Buée, Philippe Amouyel, Bart Dermaut, Jean-Charles Lambert

AAIC Vancouver Juillet 2012 :

Genetic variants involved in regulation of BIN1 expression

Anaïs Mounier, Julien Chapuis, Franck Hansmannel, Marc Gistelinck, Caroline Van Cauwenberghe, Benjamin Grenier-Boley, Yoichiro Kamatani, Benoit Delepine, Florie Demiautte, Céline Bellenguez, **Florent Letronne**, Anne-Marie Ayrat, Kristel Slegers, Sebastiaan Engelborghs, Peter Paul De Deyn, Marc Lathrop, Christine Van Broeckhoven, Philippe Amouyel, Diederik Moechars, Bart Dermaut, Jean-Charles Lambert

Bridging integrator 1 (BIN1) as a new partner of Tau ?

Julien Chapuis, Anaïs Mounier, Florie Demiautte, Yoann Sottejeau, Franck Hansmannel, Benjamin Grenier-Boley, Céline Bellenguez, **Florent Letronne**, Anne-Marie Ayrat, Philippe Amouyel, Bart Dermaut, Jean-Charles Lambert

Journée André Verbert Septembre 2012 :

ADAM30, a new key player of the APP metabolism

Florent Letronne, Geoffroy Laumet, Florie Demiautte, Anne-Marie Ayrat, David Hot, Franck Hansmannel, Anais Mounier, Yoann Sottejeau, Claudine Berr, Ludovic Huot, Florence Combe, Faiza Bensemain, Frédéric Checler, Florence Pasquier, Jean-Jacques Hauw, Yves Lemoine, Luc Buée, David Mann, Philippe Amouyel, Julien Chapuis, Jean-Charles Lambert

AAIC Boston Juillet 2013 :

An ADAM protein as a new actor of the APP metabolism

Florent Letronne, Geoffroy Laumet, Florie Demiautte, Anne-Marie Ayrat, David Hot, Franck Hansmannel, Anais Mounier, Yoann Sottejeau, Claudine Berr, Ludovic Huot, Florence Combe, Faiza Bensemain, Frédéric Checler, Florence Pasquier, Jean-Jacques Hauw, Yves Lemoine, Luc Buée, David Mann, Philippe Amouyel, Julien Chapuis, Jean-Charles Lambert

- Présentations-

Journées Distalz Novembre 2014 :

ADAM30 downregulates amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways through activation of lysosomal Cathepsin D

SOMMAIRE

Liste des abréviations

- 7 -

Introduction

-11-

1. Maladie d'Alzheimer : problème mondial de santé publique.....	- 30 -
2. Caractérisation neuropathologique de la maladie d'Alzheimer	- 32 -
2.A. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer.....	- 33 -
2.B. Dégénérescence neurofibrillaire.....	- 35 -
2.C. Dépôts amyloïdes	- 37 -
2.D. Répartition des lésions au cours de la pathologie	- 38 -
3. Physiologie du précurseur du peptide amyloïde (APP) : métabolisme et catabolisme	- 41 -
3.A. APP et APLPs	- 41 -
3.B. Production et maturation de l'APP.....	- 42 -
3.C. Métabolisme de l'APP	- 43 -
3.C.1. Voie non-amyloïdogène	- 43 -
3.C.2. Voie amyloïdogène	- 44 -
3.D. Acteurs du métabolisme de l'APP : les sécrétases	- 45 -
3.D.1. α -sécrétase	- 45 -
3.D.2. β -sécrétase	- 48 -
3.D.3. γ -sécrétase	- 49 -
4. Étiologie et processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer	- 53 -
4.A. Gènes responsables des formes familiales.....	- 53 -
4.B. L'hypothèse de la cascade amyloïde	- 55 -
4.C. Une hypothèse incomplète.....	- 56 -
4.D. Formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer et facteurs de risques	- 59 -
4.D.1. Facteurs de risques « environnementaux » de la maladie d'Alzheimer	- 60 -
4.D.1.a. Mode de vie et environnement social.....	- 60 -
4.D.1.b. Facteurs vasculaires et métaboliques	- 61 -
4.D.1.b.1. Maladies cérébrovasculaires.....	- 43 -
4.D.1.b.2. Hyperinsulinémie et Diabète de type II.....	- 44 -

4.D.1.b.3. Dyslipidémie et obésité.....	- 47 -
4.D.1.c. Stress oxydatif.....	- 66 -
4.D.1.e. Autres facteurs de risques environnementaux des formes sporadiques .	- 67 -
4.D.2. Facteurs génétiques de la maladie d'Alzheimer.....	- 68 -
4.D.2.a. Le gène de l'APOE.....	- 68 -
4.D.2.b. Les autres déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer	- 70 -
5. Homéostasie et régulation du métabolisme de l'APP	- 74 -
5.1. Régulation du trafic membranaire de l'APP	- 74 -
5.2. Contrôle de la sécrétion et exosomes.....	- 74 -
5.3. Voie endosome/lysosome et catabolisme intracellulaire de l'APP	- 76 -
5.4. Voies de l'autophagie et du protéasome.....	- 78 -
5.5. Mitochondries et catabolisme intracellulaire de l'APP.....	- 81 -
6. Famille des ADAMs, implication dans la neuropathie Alzheimer	- 82 -
6.A. Evolution des ADAMs.....	- 82 -
6.B. Structure des ADAMs.....	- 84 -
6.C. Fonctions physiologiques et Implications pathologiques des ADAMs	- 87 -
6.C.1. Fonctions physiologiques des ADAMs dans le système nerveux adulte....	- 87 -
6.C.2. Implication des ADAMs dans le développement cérébral	- 89 -
6.C.3. Autre rôle majeur des ADAMs : la fertilité	- 91 -
6.C.4. ADAMs et pathologies.....	- 93 -
6.D. Un nouvel acteur du métabolisme de l'APP : ADAM30.....	- 93 -
7. Objectif des recherches	- 98 -

Matériel et méthodes

- 81 -

1. Etude de l'expression d'ADAM30 en modèle murin.....	- 100 -
1.A. Modèle animal : souris transgéniques.....	- 100 -
1.B. Mesure de la glycémie et du poids	- 102 -
1.C. Sacrifice des souris et extraction du cerveau	- 102 -
1.D. Extraction et quantification des ARNs du cortex (qRT-PCR)	- 103 -
1.E. Mesure des A β 42 et A β 40 par ELISA et Alpha Lisa.....	- 104 -

1.F. Histologie.....	- 104 -
1.G. Reconstruction des images de cerveaux en 3D.....	- 104 -
1.H. Quantification des dépôts amyloïdes des coupes histologiques	- 105 -
2. Identification des substrats d'ADAM30	- 107 -
2.A. Identification des substrats d'ADAM30 par COFRADIC, SILAC et marquage N-terminal des protéines	- 107 -
2.B. Production des protéines recombinantes ADAM30 ^{wt} et ADAM30 ^{mut}	- 110 -
2.C. Mesure de l'activité de la CTSD <i>in vitro</i>	- 111 -
2.D. Mesure de l'activité de la CTSD <i>ex vivo</i>	- 111 -
3. Analyses du métabolisme de l'APP en fonction de l'expression d'ADAM30 ^{wt/mut} , de la CTSD ou d'IRS4 ^{wt/mut}	- 112 -
3.A. Modèles cellulaires.....	- 112 -
3.B. Construction des plasmides	- 113 -
3.C. Mutagenèse dirigée.....	- 114 -
3.D. Transfections	- 115 -
3.E. Mesure de l'internalisation de l'APP	- 116 -
3.F. Traitements inhibiteurs des Cathepsines.....	- 116 -
3.G. Traitements inhibiteurs du lysosome et protéasome.....	- 117 -
3.H. Western Blots.....	- 117 -
3.I. Tests ELISAs.....	- 118 -
3.J. Immunofluorescences et tests de lien entre protéines (Proximity Ligation Assays - PLAs).....	- 119 -
3.K. Analyses statistiques.....	- 120 -

Résultats

- 103 -

1. Caractérisation <i>ex vivo</i> de la modulation des dépôts amyloïdes par une sur-expression d'ADAM30	- 122 -
1.A. Caractérisation des lignées de souris utilisées.....	- 122 -
1.B. Quantification des dépôts amyloïdes.....	- 128 -
1.C. Cartographie 3D des dépôts amyloïdes	- 130 -
2. Recherche des substrats d'ADAM30	- 132 -

2.A. ADAM30 ne module pas directement les sécrétases du métabolisme de l'APP	- 132 -
2.B. Recherche des substrats d'ADAM30 : COFRADIC-SILAC	- 134 -
2.C. Deux substrats potentiels d'ADAM30 d'intérêt : CTSD et IRS4	- 136 -
3. Caractérisation de la Cathepsine D comme substrat d'ADAM30.....	- 140 -
3.A. ADAM30 clive et active la CTSD <i>in vitro</i>	- 140 -
3.B. Activation de la Cathepsine D par ADAM30 <i>ex vivo</i>	- 142 -
3.C. ADAM30 et la CTSD colocalisent dans les mêmes compartiments cellulaires	- 146 -
4. La modulation du métabolisme de l'APP par ADAM30 nécessite une activation spécifique de la CTSD et une séquence consensus sur l'APP	- 148 -
4.A. Inhibition des cathepsines	- 148 -
4.B. Inhibition des différentes voies de dégradation cellulaire	- 150 -
4.C. Mutation des différentes séquences consensus le l'APP-Cter	- 154 -
5. Premiers travaux de caractérisation d'IRS4 comme autre substrat d'ADAM30	- 158 -
5.A. Sur-expression d'IRS4 et modulation du métabolisme de l'APP	- 158 -
5.B. Localisation d'IRS4.....	- 160 -

Discussion et perspectives

- 147 -

1. Identification d'un nouvel acteur dans la maladie d'Alzheimer.....	- 166 -
2. Expression et étude de l'impact d'ADAM30 dans un modèle <i>in vivo</i>	- 168 -
2.A. Choix du modèle expérimental.....	- 168 -
2.A.1. Choix de la souris APP695 ^{SweInd}	- 170 -
2.A.2. Lignées CamKIIα/Cre, ADAM30 ^{wt/mut} et choix du système Cre/LoxP	- 171 -
2.B. Impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP <i>in vivo</i>	- 172 -
3. CTSD et IRS4 : substrats d'ADAM30 et acteurs du métabolisme de l'APP	- 173 -
3.A. La CTSD, protéase lysosomale et actrice du métabolisme de l'APP	- 174 -
3.B. IRS4, élément clé de l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP ?	- 178 -
4. Conclusion.....	- 180 -
5. Perspectives de recherches	- 183 -

Tableau des illustrations

- 169 -

Cette liste récapitulative contient des informations supplémentaires sur les différentes figures et tableaux du manuscrit.

Références bibliographiques

- 179 -

Annexe

- 225 -

Cette annexe contient l'article soumis récemment à *Neuron* en premier auteur.

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

Aβ	Peptide Amyloïde β
ABCA7	ATP-Binding Cassette sub-family A member 7
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin Motifs
ADN	Acide Désoxyribonucleique
ADNc	Acide Désoxyribonucleique complémentaire
AICD	APP Intracellular Domain
AK1	Adenylate Kinase 1
AMPK	AMP-Activated Protein Kinase
Aph1	Anterior Pharynx-defective 1
APLP (1, 2)	APP-Like Protein
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
APPs-α	APP soluble α
APPs-β	APP soluble β
Atg	Antithymocyte Globulin
ARNm	ARN messenger
BACE (1, 2)	Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1
BIN1	Bridging integrator 1
BSA	Bovine Serum Albumin
¹² C et ¹³ C	Carbone 12 / Carbone 13 (isotopes du carbone)
CA1	Corne d'Ammon 1 (zone de l'hippocampe)
CamKIIα	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein Kinase II
CDK5	Cyclin-Dependent Kinase 5
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHL1	Close Homolog of L1
C-ICD	Carboxy-Intracellular Domain
CLU	Clusterine
CMA	Chaperon Mediated Autophagy
CMV	Cytomegalovirus
COFRADIC	Combined FRActional Diagonal Chromatography
CR1	Complement receptor 1
C-ter	Extrémité carboxy-terminale
CTF-α	C-Terminal Fragment α
CTF-β	C-Terminal Fragment β
CTSD	Cathepsine D
DNF	Dégénérescence Neurofibrillaire
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde

DTT	Dithiothréitol
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FTDP-17	Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17
FRT	FLP Recombinaison Target
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase
GFP	Green Fluorescent Protein
Grb2	Growth factor Receptor-Bound protein 2
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GWA	Genome Wide Association study
HDL	High Density Lipoprotein
HEK293	Humain Embryonic Kidney 293
Holo-APP	APP mature et complet
Hsc70	Heat Shock Cognate protein 70
IDE	Insulin Degrading Enzyme
IGAP	International Genomics of Alzheimer's Project
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IRS	Insulin Receptor Substrate
kDa	kilo Dalton
KO	Knock-Out (extinction)
KPI	Kunitz Protease Inhibitor
KUZ	Kunitz Protease
Lamp2A	Lysosome-associated membrane protein 2
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
LCS	Liquide Cérébro-Spinal
LDL	Low Density Lipoprotein
LoxP	Locus of crossing-over
LRP-1	Low density lipoprotein Receptor-related Protein-1
MAPT	Microtubule-Associated Protein Kinase
MAM	Mitochondria-Associated Membranes
MMP	Matrix Metalloprotase
MMSE	Mini Mental State Examination
Mut	Muté/Mutant
NEAA	Non-Essential Amino Acid
N-ter	Extrémité amino-terminale
NTF	N-Terminal Fragment
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF- α	Platelet Derived Growt Factor- α polypeptide

PEN2	Presenilin Enhancer 2
PH-PTB	Pleckstrin Homology-Phosphotyrosine Binding
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PICALM	Phosphatidylinositol binding Clathrin Assembly protein
PKC	Protein Kinase C
PLA	Proximity Ligation Assay
PreP	Presequence Protease
PS1 et PS2	Préséniline 1 et 2
Rab7	RAS-related GTP-binding protein 7
RAGE	Receptor for Advance Glycation Endproducts
RE	Réticulum Endoplasmique
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative PCR
SAP97	Synapse-Associated protein 97
SDSPAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SH3	SRC Homology 3 domain
SHP-2	SRC Homology 2 domain tyrosine phosphatase 2
ShRNA	Short hairpin RNA
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
siRNA	Small interfering RNA
SKNSH-SY5Y	Cellules humaines issues de neuroblastomes
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SORL1	Sortilin-related Receptor precursor 1
SVMP	Snake Venom metalloproteinase
TACE	TNF- α - Converting Enzyme
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TOM	Translocase of the Outer Membrane
TNBS	Trinitrobenzene sulfonate
TNF	Tumor necrosis factor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WB	Western Blot
wt	WildType/Sauvage

INTRODUCTION

1. Maladie d'Alzheimer : problème mondial de santé publique

Le terme de démence (*demens* ou folie en latin) n'est pas récent et a fortement évolué grâce aux nombreuses études scientifiques et médicales menées à travers les siècles. Si par le passé le terme de démence englobait toutes formes d'atteintes psychologiques et cérébrales allant de la démence sénile à la schizophrénie ou encore la syphilis, on définit de nos jours la démence comme une pathologie ou plutôt un ensemble de pathologies neurodégénératives caractérisées par une altération progressive et irréversible des fonctions cognitives supérieures.

D'après le dernier rapport de l'Organisation Mondiale pour la Santé *Dementia: a public health priority* (OMS, rapport du 11 avril 2012 de Genève), la démence sous toutes ses formes, toucherait plus de 35,6 millions de personnes de par le monde (estimations de 2011) (Fig.1). Ces pathologies, dans leurs formes les plus communes, concernent majoritairement les populations vieillissantes, soit 6,4% des personnes âgées de plus de 60ans (prévalence standardisée sur l'âge pour l'Europe) (Lobo *et al.* 2000, Reitz *et al.* 2011). Il est souvent considéré que ces démences sont propres aux pays riches (pays développés : Europe, Etats Unis, Canada, Israël, Japon, Corée du Sud...) étant donné l'espérance de vie et la part des populations âgées dans ces pays (un tiers en 2020), or 58% des personnes atteintes de démence vivent dans un pays dont le revenu est considéré comme faible (pays émergents : Nigeria, Maroc, Bolivie) ou intermédiaire (nouveaux pays industrialisés : Brésil, Chine, Inde, Turquie...). Si chaque année 7,7 millions de nouveaux cas sont répertoriés à travers le monde, l'accroissement du niveau de vie et donc de l'espérance de vie dans ces pays devrait drastiquement augmenter. La part de ces pays dans le nombre de cas mondiaux passerait alors de 58% à 70%. Aussi si les prévisions pour les pays riches tablent pour une augmentation d'environ 150% (ex : 87% pour l'Europe) des cas d'ici 2050, elles passeraient à 350% pour les régions en développement (ex : 438% pour l'Afrique du Nord) (projections de l'OMS basées sur les estimations de Ferri *et al.* 2005). Le nombre total des démences devrait donc doubler tous les 20ans pour atteindre 65,7 millions de personnes atteintes de démences en 2030 et à 115,4 millions en 2050 (Fig.1) (rapport de 2009 de Londres de l'association Alzheimer's Disease International). Pour l'instant environ 900000 personnes sont concernées en France (Mayeux *et al.* 2003) mais ce chiffre pourrait passer à 2 millions en 2020 soit une personne sur quatre âgée de plus de 65ans

(Fig.1). En effet, la population française est dite « vieillissante » : en 2006, la part de personnes âgées de plus de 60ans était de 12 millions (16,4% de la population), elle atteindra le tiers de la population soit 22 millions en 2050, et l'augmentation est encore plus forte chez les plus de 75ans : 8% en 2006 contre plus de 16% en 2050 (INSEE, 2004). Ainsi, le nombre absolu de démences suivra cette évolution des populations : en 2004 en France, les déments de plus de 80ans représentaient 73% des cas contre plus de 84% en 2050 (estimations OMS de 2012 basées sur l'étude Paquid de Ramarosan *et al.* 2003).

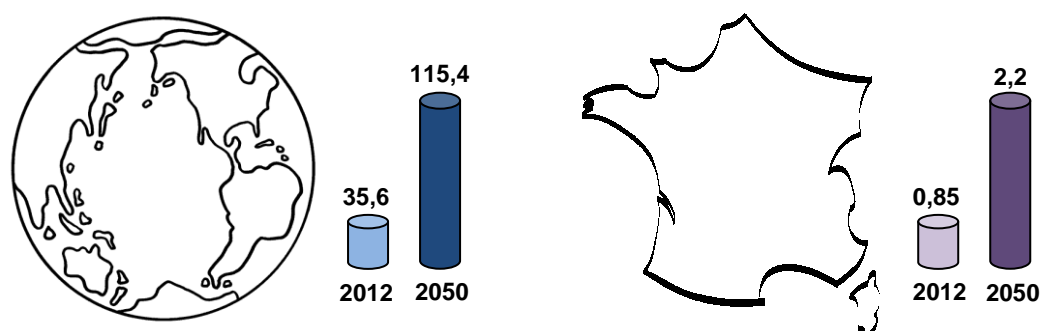


Figure 1. Estimations de progressions de la démence dans le monde et en France. D'après le rapport de Genève de l'OMS du 11 avril 2012

Les démences peuvent être classées en quatre grands groupes, bien qu'il soit difficile d'établir un diagnostic clinique clair dans certains cas : la maladie d'Alzheimer, la démence vasculaire, la démence à corps de Lewy et la démence fronto-temporale. La plupart des démences sont dites « mixtes » : une étude de Jellinger *et al.* de 2006 montre que sur 1000 patients atteints de démence dont 86% déterminés comme ayant la maladie d'Alzheimer, seuls 43% d'entre eux présentaient une maladie d'Alzheimer dite « pure », 26% une maladie d'Alzheimer avec pathologie vasculaire cérébrale et 10% une maladie d'Alzheimer avec des corps de Lewy. Finalement 7% ont été mal diagnostiqués.

La maladie d'Alzheimer représente 60 à 70% des cas de démences. Le terme de maladie d'Alzheimer remonte au début du XXe siècle et provient du nom d'un médecin, le docteur Aloïs Alzheimer qui décrivit pour la première fois les caractéristiques anatomo-pathologique de cette démence. Il étudia le cas d'Auguste Deter, une patiente âgée de 51ans présentant une démence, jusqu'à la mort de cette dernière le 8 avril 1906. En effectuant des analyses cérébrales post-mortem de sa patiente, il mit en évidence la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques

amyloïdes. Ces marqueurs sont maintenant considérés comme des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Il faudra attendre la fin du XXe siècle pour voir un véritable investissement scientifique pour cette pathologie neurodégénérative. En effet, ces dernières décennies, le nombre de cas de maladie d'Alzheimer a drastiquement augmenté principalement du fait d'une augmentation importante de l'espérance de vie. La maladie d'Alzheimer touche maintenant près de 25 millions de personnes dans le monde. Cette neuropathie voit son nombre de cas doubler tous les 5ans après 65ans. Ainsi en France, si elle touche 3,1% des femmes de plus de 70ans contre 2,9% des hommes du même âge ([Lobo et al. 2000](#), [Reitz et al. 2011](#)), cette différence de prévalence augmente fortement avec l'âge pour passer à 23,9% des hommes de plus de 85ans et 38,4% chez les femmes ([Ramaroson et al. 2003](#), [Letenneur et al. 1999](#), [Reitz et al. 2011](#)). Il faut noter que bien que cette pathologie soit déclarée essentiellement par des personnes âgées, 33000 Français de moins de 60ans sont atteints de la maladie d'Alzheimer et présentent essentiellement des formes familiales de cette maladie. La maladie d'Alzheimer, 4eme cause de mortalité en France, est l'un des enjeux majeurs de Santé publique de ce début de XXIe siècle.

2. Caractérisation neuropathologique de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'apparition lente, progressive et irréversible de troubles mnésiques et comportementaux ([Alz.org](#)):

- Troubles de la mémoire épisodique (premiers troubles à apparaître)
- Troubles de l'orientation dans le temps et l'espace
- Troubles des fonctions exécutives
- Troubles du langage (aphasie)
- Difficulté à réaliser des gestes et des actes de la vie courante malgré des fonctions motrices intactes (apraxie)
- Difficulté à reconnaître les objets ou les personnes malgré des fonctions visuelles intactes (agnosie)

- Modifications comportementales

Cette pathologie neurodégénérative est lente et évolue sur 7 à 10 ans, conduisant inexorablement à une dépendance progressive puis totale de l'individu jusqu'à son décès.

2.A. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

En France, seule la moitié des cas de maladie d'Alzheimer sont diagnostiqués et pour beaucoup tardivement principalement du fait de considérations socio-économiques. De nombreux facteurs cliniques confondants limitent l'établissement d'un diagnostic fiable de la maladie d'Alzheimer. En effet, les symptômes apparaissant peuvent être communs avec d'autres formes de démences comme la démence fronto-temporale, la démence à corps de Lewy, les démences vasculaires, ou encore un syndrome dépressif, ou un état confusionnel. Comme la maladie d'Alzheimer ne représente que 60 à 70% des cas de démences, il est nécessaire de bien discriminer les différentes pathologies cérébrales en établissant un diagnostic différentiel. Ce diagnostic différentiel est basé sur l'étude d'un ensemble de facteurs cliniques et de tests psychologiques. L'âge d'apparition et la progression des symptômes permettent d'écarter les dépressions et les états confusionnels, souvent périodiques et réversibles contrairement à la maladie d'Alzheimer, pathologie lente et progressive. Des tests combinant des évaluations neuropsychologiques comme celle du MMSE (Mini-Mental State Examination), de Lawton (évaluant partiellement le degré d'autonomie) ou de Grober et Buschke (évaluant la mémoire verbale et la mémoire à court terme) permettent d'exclure au fur et à mesure les différentes formes de démences ([Grober et al. 1988](#)). Cependant ces tests ne permettent pas de poser un diagnostic certain. Pour accroître les chances d'avoir un diagnostic fiable et précis, de nouvelles approches ont été mises au point afin de déterminer des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer comme par exemple la mesure des taux de peptides amyloïdes (A β) plasmatiques ([Van Oijen et al. 2006](#)), des taux d'A β et de protéine Tau phosphorylée dans le LCS (Liquide Cérébro-Spinal) après ponction lombaire ([Hansson et al. 2007](#), [Ewers et al. 2008](#)).

Malgré les avancées faites dans ces différents domaines, les symptômes de troubles cognitifs classiques tels que la perte de mémoire, les problèmes de raisonnement, les troubles de désorientation temporo-spatiaux... et les biomarqueurs

tels que le niveau d'A β plasmatique ou d'A β et de Tau phosphorylée dans le LCS, ne sont pas suffisamment sensible et spécifiques de la maladie d'Alzheimer (Schmand *et al.* 2010). Grâce aux approches modernes par IRM (Imagerie à Résonance Magnétique) ou TEP (Positron Emission Tomography) notamment, certaines formes de démences comme la démence vasculaire qui présente des lésions vasculaires typiques absentes chez les patients atteints d'Alzheimer, peuvent désormais être discriminées (Small *et al.* 2006, Frisoni *et al.* 2010, Hampel *et al.* 2010). Pour augmenter leur fiabilité, ces tests peuvent être effectués plusieurs fois au cours de la prise en charge du patient. Malgré cela, toutes les approches de diagnostic de cette pathologie manquent encore de spécificité et de sensibilité (Frisoni *et al.* 2013), c'est pourquoi même à un stade très avancé de la pathologie le diagnostic de la maladie d'Alzheimer reste incertain jusqu'à une validation post-mortem par examen du cerveau du patient.

A l'autopsie, les patients présentent une atrophie cérébrale généralisée et fortement marquée notamment au niveau de l'Hippocampe avec une dilatation des ventricules (*hydrocephalus ex vacuo*), un creusement des sillons et un amincissement des circonvolutions (Fig.2). Cette atrophie est due à une mort neuronale et une perte synaptique massive (Lue *et al.* 1999, Walsh *et al.* 2007), l'encéphale pouvant perdre jusqu'à 40% de son volume initial. L'analyse microscopique post-mortem révèle deux lésions caractéristiques de la pathologie Alzheimer : les dégénérescences neurofibrillaires et les dépôts amyloïdes (appelés aussi plaques séniles).

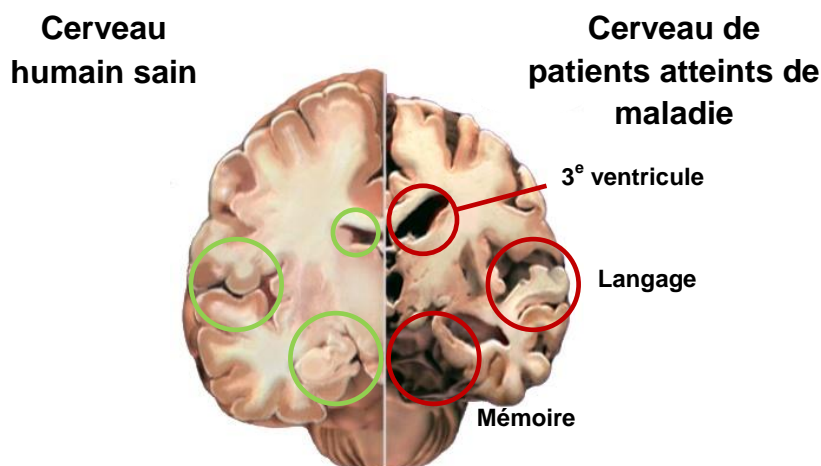
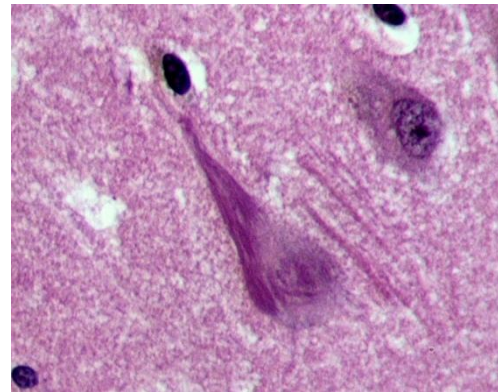
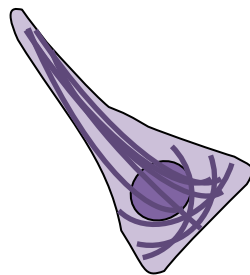


Figure 2. Comparaison de deux cerveaux de patients : l'hémisphère à gauche appartient à un patient « sain », l'hémisphère à droite provient d'un patient Alzheimer. On note une forte atrophie des zones du langage et de la mémoire, une dilatation très marquée du 3^e ventricule, un creusement des sillons et une diminution des circonvolutions. Image Alz.org

2.B. Dégénérescence neurofibrillaire

Les dégénérescences neurofibrillaires représentent les lésions majoritaires dans la plupart des Tauopathies ainsi que dans la maladie d'Alzheimer. La dégénérescence neurofibrillaire est principalement localisée au niveau des neurones pyramidaux du cortex entorhinal (Iqbal *et al.* 2005), des régions CA1 et subiculum de l'hippocampe et de l'isocortex (Braak *et al.* 1991, Delacourte et Buée, 2000). Elle est la conséquence de la formation de paires de filaments en hélice de 10nm de diamètre et extrêmement insolubles issus de l'agrégation intraneuronale de protéines Tau anormalement hyperphosphorylées (Fig.3) (Kidd 1963, Alonso *et al.* 2001, Sato *et al.* 2002).

**Dégénérescence
neurofibrillaire**



<http://library.med.utah.edu>

Figure 3. Représentations et images de dégénérescences neurofibrillaires. Les filaments violets représentent les filaments issus de l'agrégation intraneuronale de protéines Tau anormalement hyperphosphorylées. L'image d'immunomarquage des protéines Tau provient d'un cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer

La protéine Tau est indispensable à la stabilisation des microtubules axonaux (absente des dendrites) et au transport axonal (Maas *et al.* 2000). En s'associant à la tubuline, elle facilite la polymérisation des microtubules (Fig.4) (Weingarten *et al.* 1975, Avila *et al.* 2004). Chez l'humain, il existe 6 isoformes de la protéine Tau codées à partir du gène MAPT (Microtubule Associated Protein Tau) présent en position q21 sur le chromosome 17 (Goedert *et al.* 1989, Duff *et al.* 2000). La protéine est composée globalement de 4 domaines : un domaine N-terminal et C-terminal, une région riche en prolines et un domaine de liaison aux microtubules

constitué de 3 à 4 sous-domaines de répétitions selon les isoformes (Tau 3R ou Tau 4R) (Goedert et al. 1989, Duff et al. 2000). Il existe 45 sites de phosphorylations de la protéine Tau (sérines et thréonines) susceptibles d'être modifiés par ses principales kinases telles que la GSK3 β (Glycogène Synthase Kinase 3 β) ou CDK5 (Michel et al. 1998, Lund et al. 2001, Sergeant et al. 2008). Le domaine de liaison aux microtubules chargé positivement confère à la protéine Tau ses capacités à s'associer à la tubuline (Duff et al. 2000). La phosphorylation de ce domaine diminue progressivement la charge positive de la protéine Tau. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est anormalement hyperphosphorylée ce qui neutralise les charges au niveau du domaine de liaison au microtubule. La protéine Tau ne pouvant plus s'arrimer à la tubuline, les microtubules se polymérisent de façon anarchique puis se déstabilisent (Fig.4). Parallèlement, les protéines Tau hyperphosphorylées s'agrègent pour former des paires de filaments en hélice s'accumulant pour arriver à une dégénérescence neurofibrillaire (Fig.3 et 4) (Hanger et al. 1998, Alonso et al. 2001, Sato et al. 2002). En plus de la désorganisation du cytosquelette et de l'arrêt du transport axonal, la toxicité engendrée par les dégénérescences neurofibrillaires finissent par conduire à la mort neuronale et à la détérioration complète de la cellule pour ne laisser que le « squelette » (Braak et al. 1994, Buée et al. 2000).

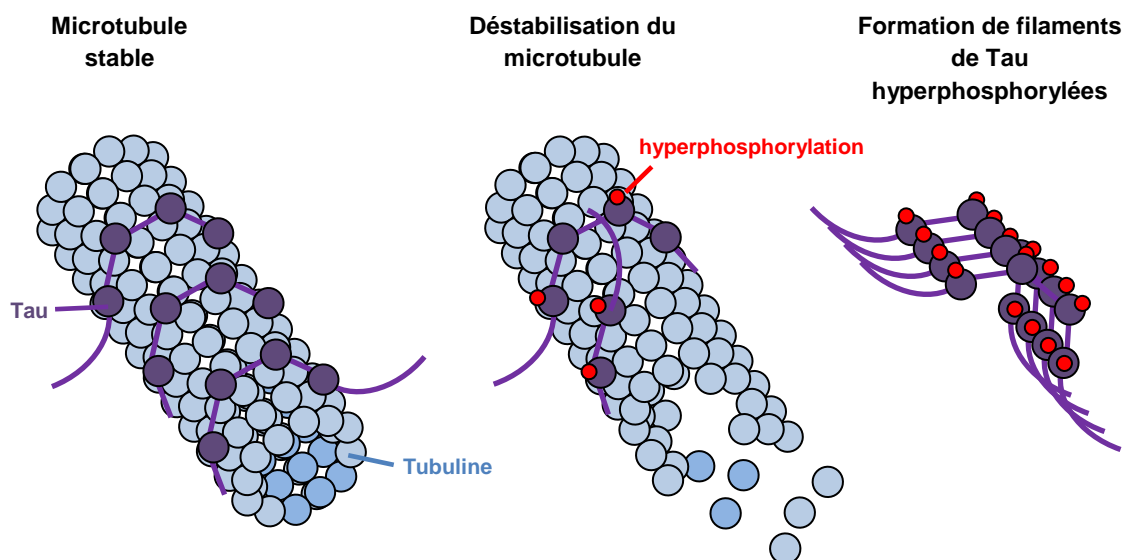


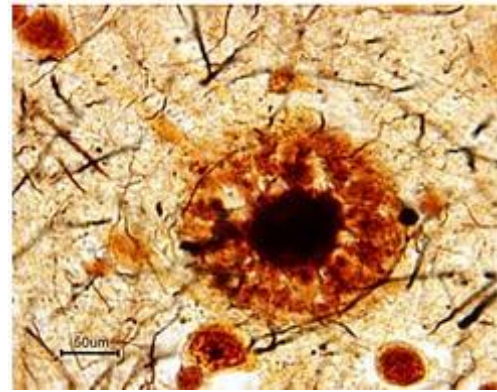
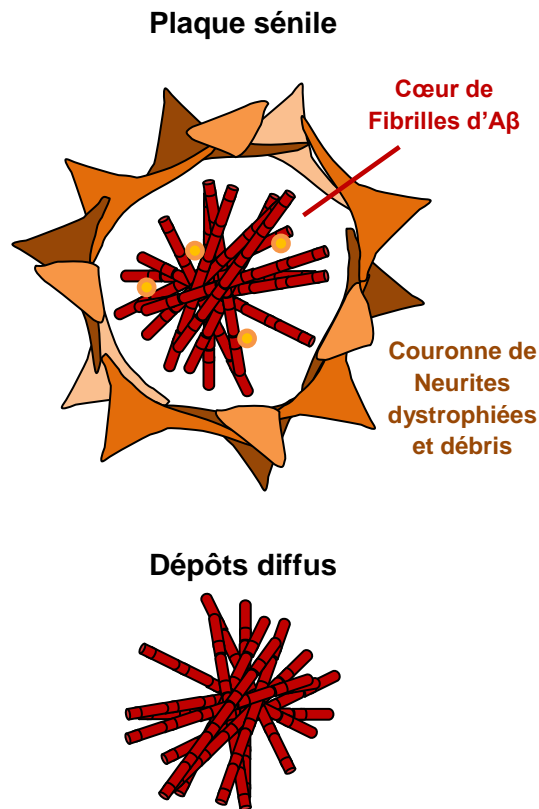
Figure 4. Représentation de l'implication physiopathologique de Tau dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules. Son hyperphosphorylation au cours de la pathologie conduit à une désagrégation des microtubules, à la déstabilisation du cytosquelette puis à la mort neuronale. D'après Hanger et al. 1998 et Braak et al. 1994

Tout comme les plaques amyloïdes, les dégénérescences neurofibrillaires ne sont pas une caractéristique propre à la maladie d'Alzheimer. Elles sont retrouvées dans de nombreuses neuropathies comme la démence fronto-temporale (associée à une maladie de Parkinson et liée au chromosome 17 appelée aussi FTDP-17), la maladie de Pick, la dégénérescence corticobasale, la démence pugilistique ou encore dans le syndrome de Down et au cours d'un vieillissement normal.

2.C. Dépôts amyloïdes

On distingue globalement deux types de plaques amyloïdes : les dépôts diffus et les plaques denses appelées aussi plaques séniles (Fig.5). Bien que le processus ne soit pas encore décrit, Il semblerait que les dépôts diffus puissent maturer progressivement en plaques denses dans le cadre de la pathologie (Iwatsubo *et al.* 1995, Suzuki *et al.* 2012). Initialement, les $A\beta_{x-42}$ plus neurotoxiques et possédant des propriétés fibrillogéniques importantes, commencent à former des oligomères puis des fibrilles en feuillet β , qui s'agrègent et auxquels adhèrent l' $A\beta_{x-40}$, puis s'assemblent en filaments et enfin en plaques sphériques extraneuronales d'environ 50 μ m (Ohnishi *et al.* 2004). Si le cœur des plaques diffuses est uniquement constitué de filaments d' $A\beta_{x-42}$ d'environ 10nm, celui des plaques séniles contient aussi de l' $A\beta_{x-40}$ et est entouré progressivement d'autres protéines comme de l'APOE, du cholestérol, des enzymes lysosomales (cathepsine D ou CTSD, cathepsine B ou CTSB) (Namba *et al.* 1991, Dickson *et al.* 1997, Burns *et al.* 2003, Querfurth et LaFerla, 2010) mais aussi d'une couronne de synapses dystrophiques et de neurites contenant beaucoup de dégénérescence neurofibrillaire (Fig.5).

Une gliose réactionnelle est détectée uniquement autour des plaques séniles témoignant d'une réponse immunitaire et d'une inflammation (McGeer *et al.* 2006). Cependant, les plaques séniles seraient plus un marqueur de la pathologie qu'une cause, cet effet serait porté par les oligomères d' $A\beta$ libres beaucoup plus neurotoxiques (Selkoe 2001, Cleary *et al.* 2005, Morley *et al.* 2014). Les plaques séniles ne sont pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer. En effet, elles peuvent être observées au sein d'autres maladies neurodégénératives comme la démence à corps de Lewy, mais aussi dans le syndrome de Down ou dans les cerveaux de patients âgés sains (Mann *et al.* 1990).



<http://www.alzheimer-montpellier.org>

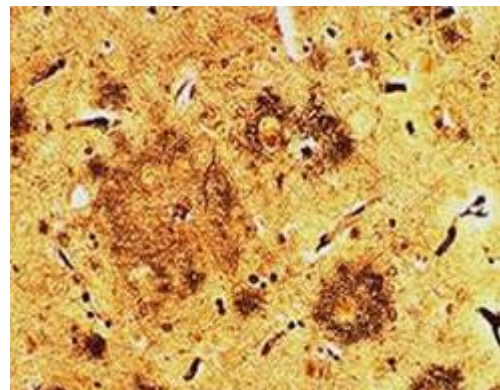


Figure 5. Représentations et images de dépôts amyloïdes. Il en existe deux types : les plaques séniles et les dépôts diffus. Les images proviennent de cerveaux de patients Alzheimer

2.D. Répartition des lésions au cours de la pathologie

Braak et Braak ont procédé à une topographie des dégénérescences neurofibrillaires en fonction des différents stades de la maladie d'Alzheimer. Dans un premier temps, les dégénérescences neurofibrillaires sont retrouvées au niveau de la région transenthorinale puis enthorinale (Stades de Braak I et II) (Fig.6). Les lésions progressent ensuite plus loin dans le système limbique jusque dans les régions CA1 et le subiculum de l'hippocampe (Stades de Braak III et IV) (Fig.6). Enfin, dans les stades ultimes de la pathologie, l'hippocampe est entièrement touché et de nombreuses lésions sont détectées dans l'isocortex (Stades de Braak V et VI) (Fig.6) (Braak et Braak. 1991, Delacourte et Buée, 2000).

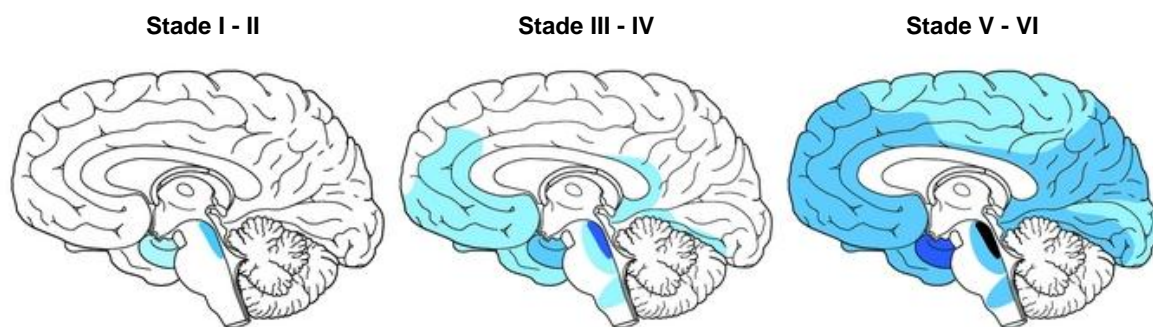


Figure 6. Schématisation de la localisation des dégénérescences neurofibrillaires au cours de la maladie d'Alzheimer selon six stades. L'intensité de la coloration est corrélée à la quantité de dégénérescences neurofibrillaires. Ann Neurol Adapté de Braak et al. 1991

Comme pour les dégénérescences neurofibrillaires, Braak et Braak ont procédé à une topographie des plaques amyloïdes. Elles sont retrouvées dans l'ensemble du cortex et de l'hippocampe (Fig.7) (Braak *et al.* 1991, Delacourte et Buée, 2000). Les dépôts apparaissent initialement au niveau des lobes temporaux, frontaux et occipitaux en position basale (stade de Braak A), puis s'étendent progressivement à la couche CA1 (Corne d'Ammon) et au subiculum dans l'hippocampe ainsi que dans une grande partie de l'isocortex (stade de Braak B). Enfin, au stade de Braak C, les dépôts amyloïdes sont observés dans tout l'isocortex (Fig.7) (Braak *et al.* 1991, Delacourte et Buée, 2000).

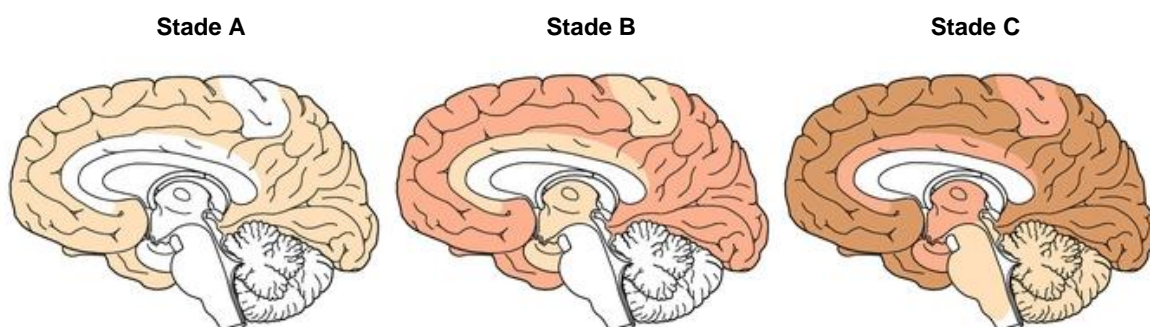


Figure 7. Schématisation de la localisation des dépôts amyloïdes au cours de la maladie d'Alzheimer selon trois stades. L'intensité de la coloration est corrélée à la quantité de dépôts. Ann Neurol Adapté de Braak et al. 1991

Il est intéressant de noter que les aires de propagations des dépôts amyloïdes ne coïncident pas toutes avec celles des dégénérescences neurofibrillaires. En effet, les dégénérescences neurofibrillaires sont plus abondantes au niveau de l'hippocampe que dans l'isocortex, alors que la topographie des plaques séniles montre l'inverse (Braak et Braak. 1991, Delacourte et Buée, 2000).

En plus des dégénérescences neurofibrillaires et des plaques amyloïdes, une troisième altération est présente dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. La perte progressive et irréversible de neurones essentiellement pyramidaux, noradrénergiques et cholinergiques constitue cette troisième lésion typique. Dès le stade dit « transenthorinal », Les neurones pyramidaux de la couche III et IV du cortex cérébral sont les plus touchés par cette mort neuronale mais aussi par les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires (Fig.8). La majorité des terminaisons de ces neurones constitue les neurites dystrophiques localisées au niveau des plaques amyloïdes. Cette perte neuronale progresse ensuite vers les noyaux sous-corticaux (Noyau basal de Meynert, septum médian, locus coeruleus) entraînant une perte des fibres ascendantes dans toutes les aires du cortex et donc un isolement progressif des aires cérébrales (Fig.8) (Braak *et al.* 1998, Palmer 2002).

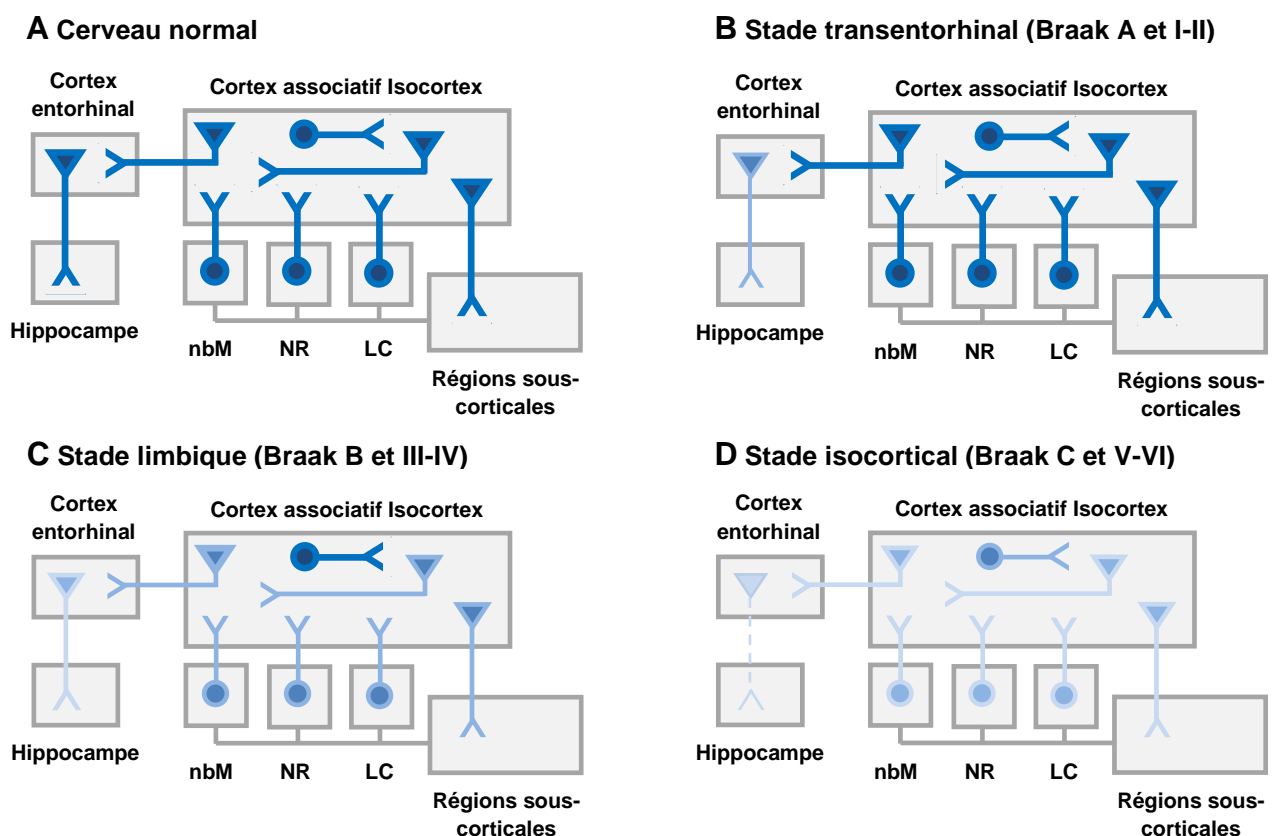


Figure 8. Progression de la perte neuronale au cours de la maladie d'Alzheimer. Les premiers neurones atteints sont les neurones pyramidaux du cortex entorhinal projetant sur l'hippocampe (B). Les régions sous corticales sont ensuite touchées avec la perte des fibres ascendantes provenant du noyau basal de Meynert (nbM), du noyau du Raphé (NR) et du locus coeruleus (LC) (C et D). (Braak et al. 1998, Palmer 2002)

Bien que l'étude des dégénérescences neurofibrillaires et du processus pathologique conduisant à l'apparition de ces lésions soit tout aussi important que la compréhension du mécanisme d'apparition des plaques amyloïdes dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer, nous avons fait le choix ici de ne vous présenter essentiellement que la partie amyloïde. Ce choix découle de l'orientation des recherches de notre laboratoire portées sur la compréhension des mécanismes et des facteurs intervenant dans la régulation du métabolisme de l'APP dont les peptides amyloïdes sont issus.

3. Physiologie du précurseur du peptide amyloïde (APP) : métabolisme et catabolisme

3.A. APP et APLPs

L'APP est membre d'une famille de protéines très conservées au cours de l'évolution : APL-1 chez *C. elegans*, APPL chez la drosophile et les APLPs (APP-like Proteins) chez les mammifères (Fig.9). Comme l'APP, les APLPs sont des protéines transmembranaires de type I mais ne possèdent pas de séquence du peptide amyloïde et sont donc incapables de produire de l'A β . L'APLP1 comporte 650 acides aminés contre 763 pour l'APLP2 qui possède en plus un domaine KPI (Kunitz Protease Inhibitor). Si une délétion en APP et APLP1 n'est pas létale et ne présente que des petites répercussions au niveau somatique ou comportemental *in vivo*, une délétion en APLP2 seule ou avec l'APP est létale au stade embryonnaire (Herms et al. 2004, Anliker et al. 2006). Les APLPs sont métabolisés par les mêmes sécrétases que l'APP conduisant à la libération du domaine intracellulaire C-terminal (C-terminal ICD) pouvant jouer un rôle dans la signalisation cellulaire (Xu et al. 2007).

Les peptides amyloïdes, que ce soient les A β _{x-40} ou A β _{x-42}, qui s'accumulent, s'agrègent et forment des plaques amyloïdes et proviennent tous du métabolisme de la même protéine : le précurseur du peptide amyloïde ou APP (Kang et al. 1987, De Strooper et al. 2010). Cette protéine est issue d'un gène, porté par le chromosome 21 codant 4 isoformes de l'APP dans le système nerveux central : l'APP₇₇₀, l'APP₇₅₁,

l'APP₇₁₄ et l'APP₆₉₅ (Fig.9) (Kang *et al.* 1990, Golde *et al.* 1990). Ces 4 isoformes sont issues d'un épissage alternatif différent en fonction du type cellulaire exprimant l'APP.

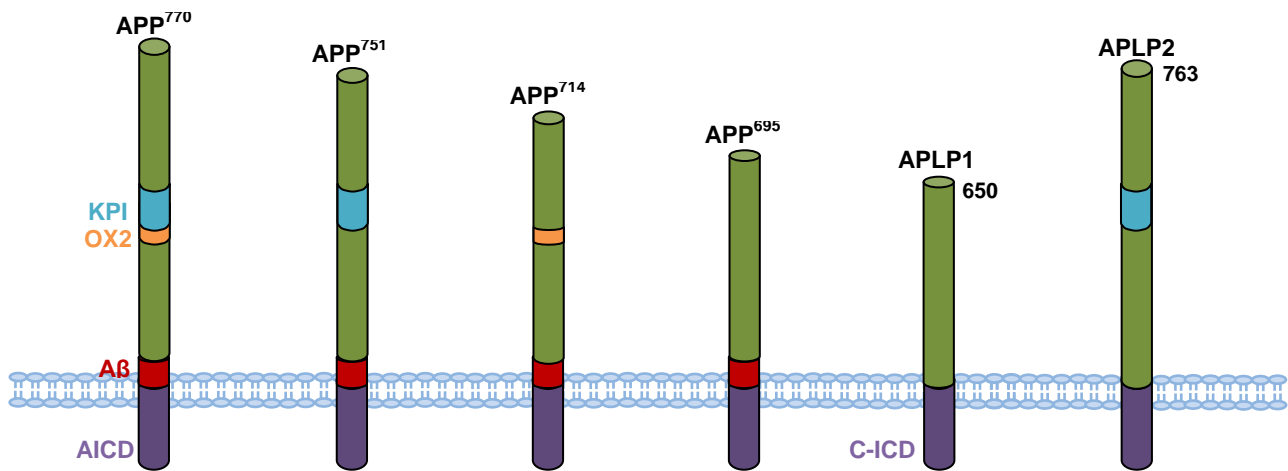


Figure 9. Représentation schématique des différents membres de la famille de l'APP : l'APP⁷⁷⁰, l'APP⁷⁵¹, l'APP⁷¹⁴ et l'APP⁶⁹⁵, APLP1 et APLP2

3.B. Production et maturation de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type I d'environ 100kDa composée de 3 à 5 domaines selon l'isoforme étudiée (Fig.9). L'APP₇₇₀ est l'isoforme la plus longue et la plus ubiquitaire. Son expression ainsi que celle de l'APP₇₁₄, est retrouvée au niveau des astrocytes et des cellules gliales (Tanaka *et al.* 1988, De Strooper *et al.* 2010). L'APP₇₅₁ et l'APP₆₉₅ sont toutes deux des isoformes neuronales mais seule l'APP₆₉₅ est majoritairement exprimée dans les neurones (Tanaka *et al.* 1989, De Strooper *et al.* 2010). L'APP₆₉₅ ne contient que trois domaines, une grande partie N-terminale extracellulaire, un seul domaine transmembranaire hydrophobe (d'où son appartenance au type I) et un petit domaine intracellulaire en C-terminal (Fig.9). L'APP₇₇₀, possède deux domaines de plus, un domaine KPI et un domaine OX2 (homologie avec l'antigène MRC OX-2 trouvé sur la surface des neurones et des thymocytes) (Fig.9) (Rebeck *et al.* 2001). Les APP₇₅₁ et ₇₁₄ ont respectivement perdu le domaine OX2 et KPI (Selkoe *et al.* 1988, Gralle et Ferreira, 2007). Bien que ces isoformes aient des compositions différentes essentiellement de par leur domaine N-terminal, elles comportent toutes dans leur partie C-terminale, une séquence protéique correspondant au peptide amyloïde.

Avant d'arriver à la membrane plasmique et entrer dans son métabolisme, l'APP va subir une série de modifications post-traductionnelles essentielles. En passant par la voie de sécrétion dite « classique » (réticulum endoplasmique RE, appareil de Golgi, vésicules de sécrétions), l'APP va perdre son peptide signal de 17 acides aminés, puis va être phosphorylé, N- et O-glycosylé, sulfaté (Sambamurtie *et al.* 2002), sialylé et enfin acquérir sa structure tridimensionnelle. La forme maturée et ancrée à la membrane représente la majorité de l'APP cellulaire. Il existe ensuite deux voies métaboliques possibles pour cet APP membranaire caractérisées par la combinaison de trois activités enzymatiques importantes (Mattson *et al.* 1997, Nunan *et al.* 2002, Ling *et al.* 2003): la voie non-amyloïdogène faisant intervenir l' α -sécrétase et la γ -sécrétase, et la voie amyloïdogène impliquant la β -sécrétase puis la γ -sécrétase.

3.C. Métabolisme de l'APP

3.C.1. Voie non-amyloïdogène

Dans cette voie, l' α -sécrétase localisée au niveau de la membrane plasmique, clive l'APP₆₉₅ entre la lysine 612 et la leucine 613, séparant sa partie N-terminale extracellulaire de sa partie C-terminale (Fig.10). Les deux fragments obtenus sont un APP soluble α (APPs- α) sécrété hors de la cellule et un fragment C-terminal ou CTF- α de 83 acides aminés (C83), restant ancré à la membrane. A la membrane ou après internalisation dans les endosomes et lysosomes, ce CTF- α est alors clivé à son tour par la γ -sécrétase produisant deux autres fragments : un peptide de 3 kDa (P3) et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD), pouvant être transloqué dans le noyau et ayant potentiellement un rôle de facteur de transcription (Fig.10) (Selkoe *et al.* 2001, LaFerla *et al.* 2005, Pardossi-Piquard et Checler 2012). L' α -sécrétase clivant l'APP au niveau de la séquence peptidique du peptide amyloïde (entre les acides aminés 596 et 640), cette voie ne conduit donc pas à la formation de peptides amyloïdes et est appelée « non-amyloïdogène » (Esch *et al.* 1990, Wang *et al.* 1991, De Strooper *et al.* 2010).

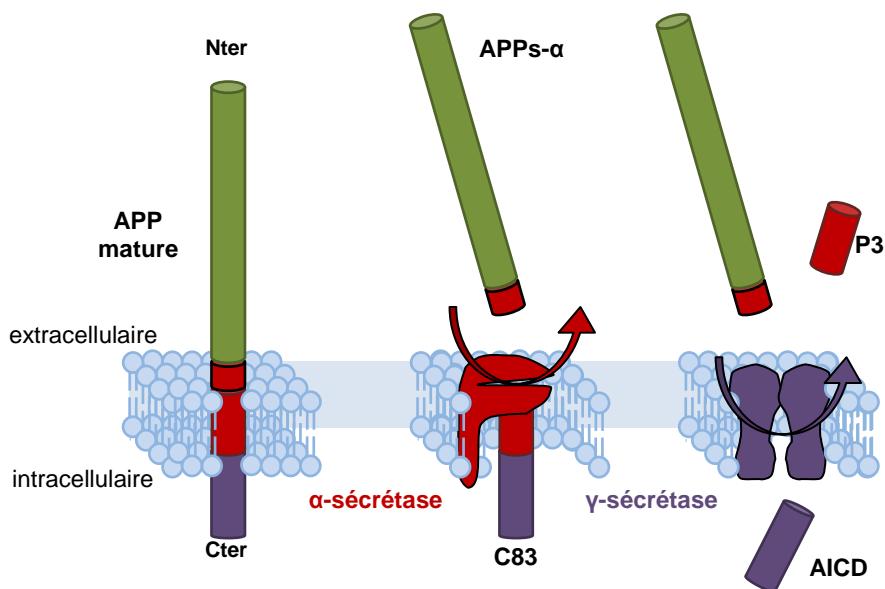


Figure 10. Représentation schématique du clivage séquentiel de l'APP par les α et γ -sécrétases impliquées dans la voie non-amyloïdogène. Cette voie localisée à la membrane plasmique ne conduit pas à la libération de peptides amyloïdes

3.C.2. Voie amyloïdogène

A son arrivée à la membrane plasmique, l'APP va être internalisé dans les endosomes puis les lysosomes où il va être clivé entre la méthionine 596 et l'acide aspartique 597 par la β -sécrétase en deux fragments : l'APP soluble β (APPs- β) pouvant être sécrété par exocytose dans le milieu extracellulaire, et le CTF- β de 99 acides aminés (C99) restant ancré dans la membrane vésiculaire (Fig.11). Ce fragment va alors subir un nouveau clivage protéolytique par la γ -sécrétase générant de l'AICD, et un fragment de 39 à 43 acides aminés, le peptide amyloïde (Fig.11) (LaFerla *et al.* 2005, Chen *et al.* 2006). En conditions physiologiques, la voie non-amyloïdogène prend en charge près de 90% de l'APP mature. Les 10% restant entrent dans la voie amyloïdogène où l'A β_{x-40} représente près de 80% du total de peptides amyloïdes produits contre un peu plus de 20% pour l'A β_{x-42} (Ahmed *et al.* 2010).

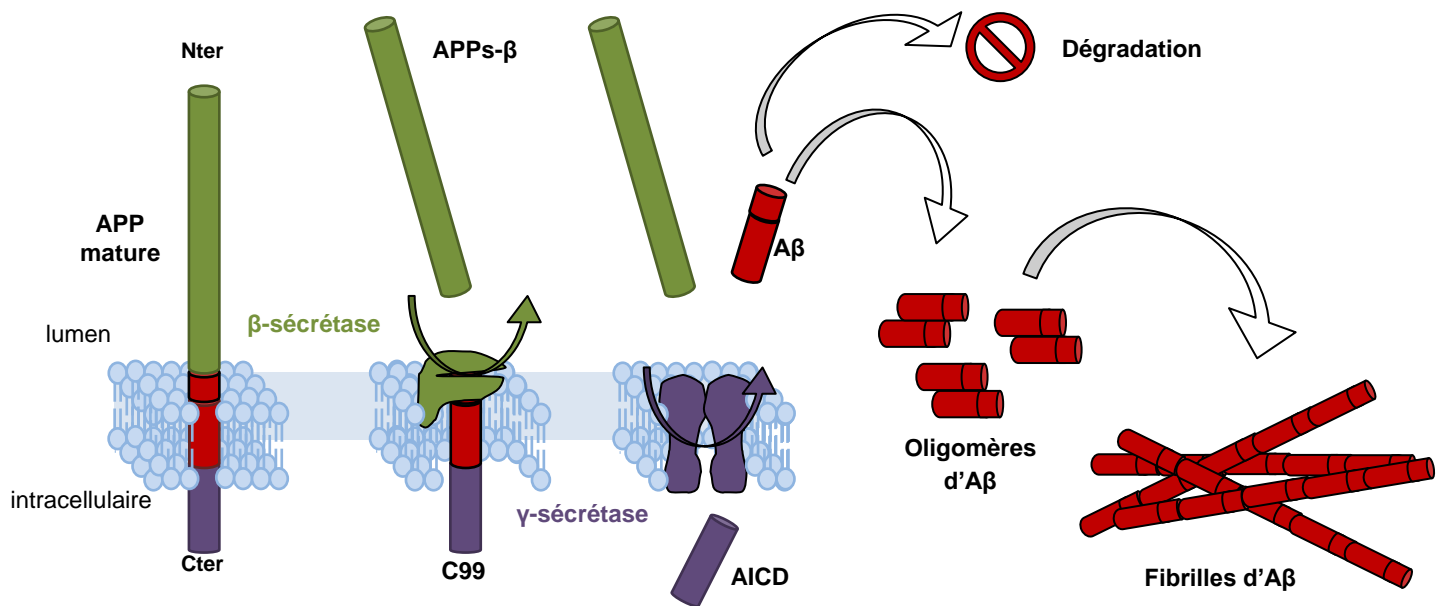


Figure 11. Représentation schématique du clivage séquentiel de l'APP par les β et γ -sécrétases impliquées dans la voie amyloïdogène. Cette voie localisée essentiellement au niveau endosomes/lysosomes permet la libération du peptide amyloïde. Dans la maladie d'Alzheimer, ce peptide s'accumule puis s'oligomérisse et enfin forme des fibrilles

3.D. Acteurs du métabolisme de l'APP : les sécrétases

3.D.1. α -sécrétase

En clivant l'APP entre les résidus 16 et 17 de la séquence correspondant au peptide amyloïde, l' α -sécrétase est un acteur principal de la voie non-amyloïdogène (Fig.10 et 12) (Esch *et al.* 1990, Wang *et al.* 1991, De Strooper *et al.* 2010). Il a été démontré que l' α -sécrétase est impliquée dans les deux voies de sécrétions cellulaires : (1) dans la voie de sécrétion constitutive, l'APP est clivé par l' α -sécrétase générant ainsi de l'APPs- α sécrété dans le milieu extracellulaire. (2) dans la voie de sécrétion régulée, l'APP est clivé par l' α -sécrétase sous contrôle de la PKC (Protein Kinase C), protéine contrôlant la voie de sécrétion régulée. L'utilisation d'ester de phorbol stimulant l'activité de la PKC ou l'utilisation d'agonistes du récepteur α -7-nicotinique à l'acétylcholine, augmentent l'activité de l' α -sécrétase. Ceci conduit à l'élévation de la sécrétion d'APPs- α et favorise une diminution importante de la production des peptides amyloïdes (Caporaso *et al.* 1992, Hung *et al.* 1993, Vingtdeux *et al.* 2012). La majorité de l'activité α -sécrétase se situe à la membrane plasmique mais aussi au

niveau du réseau transgolgien. L'utilisation d'inhibiteurs des ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) et des approches basées sur la délétion génique ont pu mettre en évidence la composition de l' α -sécrétase : l'activité de cette sécrétase est composée ou tout du moins dépendante de protéines de la famille des ADAMs (Arribas *et al.* 1996, Asai *et al.* 2003, Taabe *et al.* 2007). Il existe en fait plusieurs protéines ayant une activité α -sécrétase, toutes issues de la famille des ADAMs : ADAM17, ADAM10 et ADAM9.

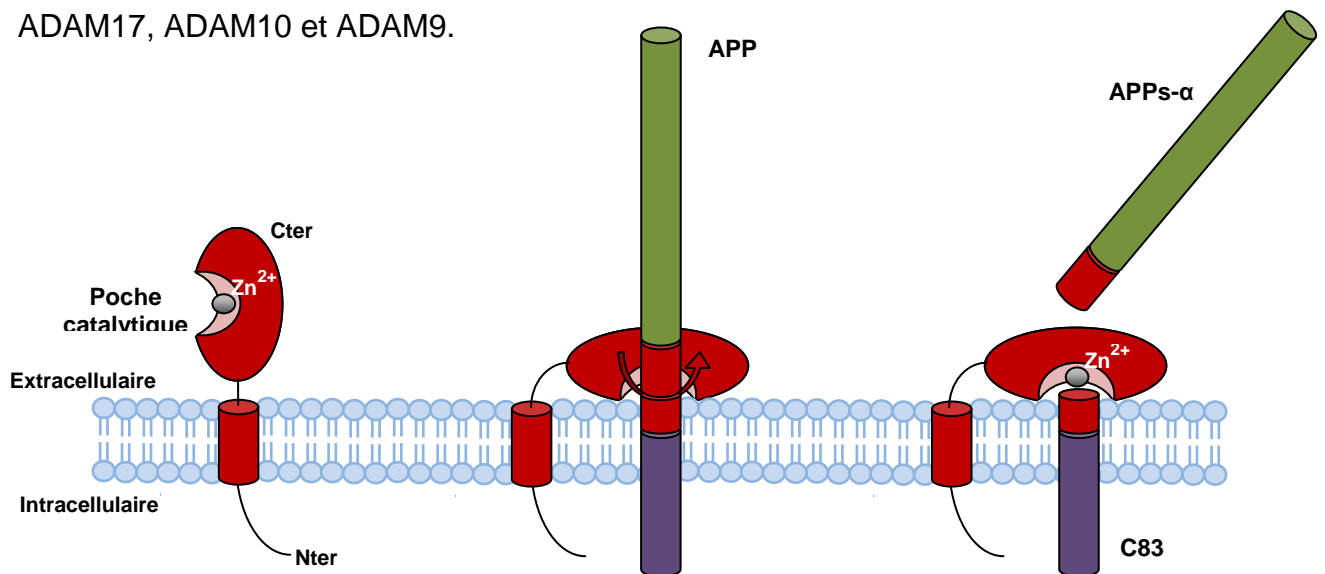


Figure 12. Représentation d'une α -sécrétase et de son action catalytique sur l'APP au niveau de la membrane plasmique

ADAM17, appelée aussi TACE (Tumor Necrosis Factor- α Convertase), est connue pour convertir le Pro-TNF en une cytokine pro-inflammatoire de 26kDa (Black *et al.* 1997, Edwards *et al.* 2008). Il a été montré *in vitro* qu'ADAM17 est capable de cliver un peptide synthétique de 18-mères mimant le site de clivage de l' α -sécrétase sur l'APP (Buxbaum *et al.* 1998). Cependant bien qu'ADAM17 semble capable d'induire une augmentation de la sécrétion d'APPs- α par la voie constitutive (Slack *et al.* 2001), la majorité des études montrent que son activité α -sécrétase dépendrait essentiellement de sa régulation par la PKC et donc de la voie de sécrétion régulée (Buxbaum *et al.* 1998, Blacker *et al.* 2002, Kojro *et al.* 2006). Chez l'humain, ADAM17 est exprimée au niveau des neurones pyramidaux de la couche granuleuse de l'hippocampe essentiellement mais aussi dans les neurones pyramidaux du cortex cérébral. Une colocalisation avec les plaques amyloïdes a été retrouvée chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer sans modification de l'expression d'ADAM17 (Skovronsky *et al.* 2001).

Tout comme ADAM17, ADAM10, aussi appelée KUZ (Kuzbanian) est capable de cliver le peptide synthétique mimant le site de clivage de l' α -sécrétase sur l'APP (Lammich *et al.* 1999). Cependant, seule la sur-expression d'ADAM10 dans des cellules HEK293 (Cellules embryonnaires de rein humaines) augmente l'activité de l' α -sécrétase dépendant de la voie de sécrétion constitutive et de la voie de sécrétion régulée, conduisant à une augmentation de la production d'APPs- α (Lammich *et al.* 1999, Kuhn *et al.* 2010). L'extinction d'ADAM10 à l'aide d'un siRNA conduit à une diminution du clivage de type α -sécrétase sur l'APP laissant penser qu'ADAM10 pourrait jouer essentiellement sur la voie de sécrétion constitutive (Kuhn *et al.* 2010). Contrairement à ADAM17, ADAM10 est exprimée largement dans les neurones corticaux de la même façon que l'APP chez l'humain (Howard *et al.* 1996, Bernstein *et al.* 2003) et son niveau d'expression est réduite chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Colciaghi *et al.* 2002, Bernstein *et al.* 2003).

Contrairement à ADAM17 et ADAM10, ADAM9 (ou Meltrine γ) n'est pas capable de cliver le peptide synthétique de 18-mères (Koike *et al.* 1999). Ceci explique pourquoi de nombreux auteurs de la littérature écartent ADAM9 du groupe des α -sécrétases, ne parlant que d'ADAM10 et d'ADAM17. Cependant, ADAM9 pourrait cliver l'APP non pas entre la Lysine 16 et la Leucine 17 mais entre l'Histidine 14 et la Glutamine 15 (Simons *et al.* 1996, Endres *et al.* 2003) et serait uniquement impliquée dans la voie de sécrétion régulée (Kuhn *et al.* 2010). Aussi, il a été montré qu'un traitement à l'ester de phorbol conduisait à une phosphorylation du domaine C-terminal d'ADAM9 sans montrer pour autant un changement d'activité (Koike *et al.* 1999, Roghani *et al.* 1999). ADAM9 pourrait intervenir dans le clivage activateur d'ADAM10 et donc jouer indirectement sur le clivage de l'APP (Toussey *et al.* 2009).

Il a récemment été montré qu'ADAM10 est la protéase portant l'activité α -sécrétase (Kuhn *et al.* 2010). Cependant nous ne pouvons pas exclure que d'autres ADAMs puissent jouer un rôle important pour l'activité de l' α -sécrétase : (1) Il semblerait qu'ADAM17 et ADAM9 aient un rôle important dans l'activité de l' α -sécrétase au niveau de la voie de sécrétion régulée (Lopez-Perez *et al.* 2001, Endres *et al.* 2003) et (2) il a été montré que d'autres ADAMs pourraient aussi influencer l'activité α -sécrétase comme ADAM8 ou ADAM19 (Naus *et al.* 2006, Tanabe *et al.* 2007).

3.D.2. β -sécrétase

La β -sécrétase est spécifique de la voie amyloïdogène et conduit à la formation du peptide amyloïde en clivant l'APP entre le résidu Méthionine -1 et Aspartate 1 de la séquence du peptide amyloïde. Il existe aussi un site alternatif de clivage de l'APP par la β -sécrétase localisé entre les résidus Tyrosine 10 et Glutamate 11 appelé site β' -sécrétase (Fig.11 et 13) (Vassar *et al.* 1999, Cole *et al.* 2008). L'activité β -sécrétase est en fait portée par deux protéines différentes : BACE1 (β -site APP Cleaving Enzyme 1) et BACE2. BACE1 et BACE2 sont des homologues partageant 71% d'homologies de séquence chez l'humain (Acquatti *et al.* 2000, Southan *et al.* 2013). Ces aspartyles protéases transmembranaires de type I possèdent un domaine catalytique dans leur partie N-terminal. Elles sont retrouvées essentiellement au niveau des structures post-Golgiennes et des endosomes, leur activité étant optimale à un pH acide, mais aussi au niveau de la membrane plasmique (Ehehalt *et al.* 2002). Dans ces compartiments cellulaires, BACE1 et BACE2 présentent leur site actif du côté luminal de la membrane (Fig.13). Si elles sont toutes deux exprimées au niveau du cerveau, l'expression de BACE2 est beaucoup plus faible que celle de BACE1 et est principalement localisée au niveau des cellules gliales (Laird *et al.* 2005, Holler *et al.* 2012). Pour être actives les BACEs doivent s'homodimériser pour que le prodomaine soit clivé par des furines du réseau transgolgien. Enfin, leurs deux résidus Aspartates (essentiels à leur activité catalytique) vont être glycosylés et trois ponts disulfures sont formés (pouvant expliquer la spécificité de la BACE pour l'APP) (Haniu *et al.* 2000, Hunt *et al.* 2009).

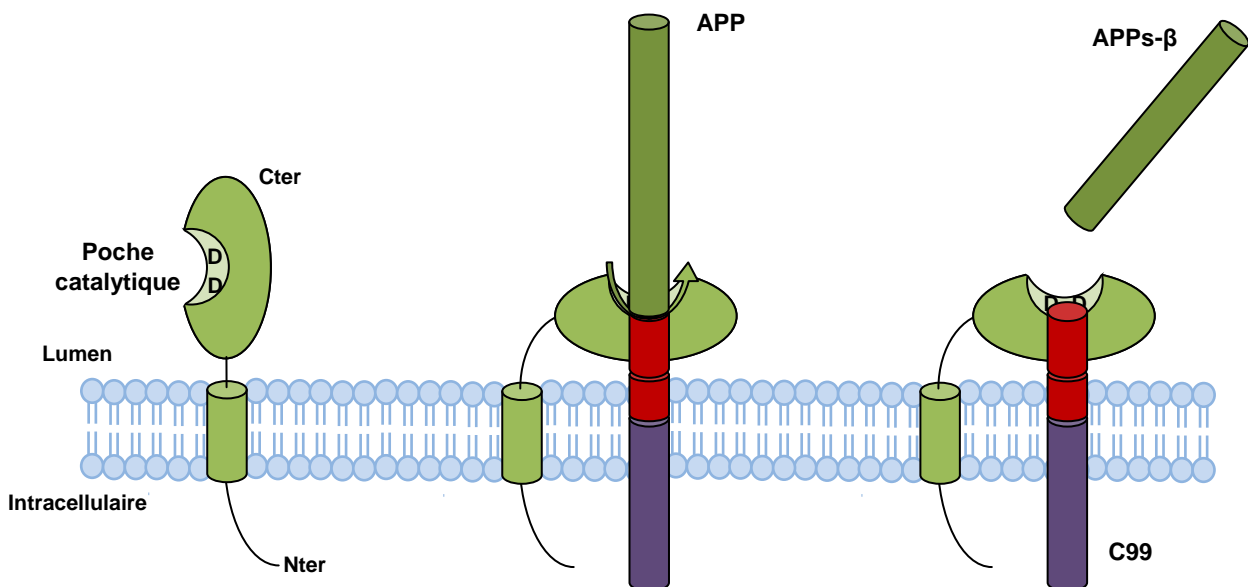


Figure 13. Représentation d'une β -sécrétase et de son action catalytique sur l'APP au niveau des endosomes essentiellement

Le niveau d'expression et l'activité de BACE1 ont été retrouvés augmentés dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Yang *et al.* 2003). Par contre, BACE2 ne semble pas être impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Chez des souris surexprimant un APP^{swe} humain, l'extinction du gène de BACE1 (par KO) abolit presque complètement la production de peptide amyloïde (Farzan *et al.* 2000, Laird *et al.* 2005). Cependant il a été montré que des souris KO pour le gène BACE1 présentaient un comportement moteur altéré et une augmentation de sensibilité à la douleur, probablement liés à l'hypomyélinisation constatée. Une autre étude montre chez ces animaux des altérations comportementales et cognitives importantes, liées à une réduction du nombre de synapses des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Savonenko *et al.* 2008). Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que BACE1 possède en plus de l'APP, d'autres substrats impliqués eux aussi dans des voies physiologiques importantes (Laird *et al.* 2005, Hitt *et al.* 2010).

3.D.3. γ -sécrétase

La γ -sécrétase est commune aux deux voies du métabolisme de l'APP et intervient après clivage de l'APP par l' α -sécrétase ou la β -sécrétase (Fig.10 et 11). Alors que les activités α -sécrétase et β -sécrétase sont portées par une seule protéine, la γ -sécrétase est un complexe multiprotéique transmembranaire composé de 4 protéines différentes: PS1 ou PS2, PEN2 (presenilin enhancer 2), la Nicastrine et l'Aph1 A ou l'Aph1B (Anterior pharynx defective 1) (Fig.14) (Vetrivel *et al.* 2006). Avec les deux isoformes de la préséniline et de l'Aph1, il existe donc au total 6 complexes de la γ -sécrétase possibles. L'activité γ -sécrétase est retrouvée essentiellement dans les mêmes sites que les autres sécrétases, autrement dit au niveau de la membrane plasmique où elle intervient après l' α -sécrétase et au niveau des endosomes et lysosomes où elle agit après la β -sécrétase. On retrouve également une localisation au niveau post-golgien mais de façon minoritaire (Haas *et al.* 2002).

Le clivage de l'APP par la γ -sécrétase ne serait pas unique mais séquentiel. Cette sécrétase peut cliver l'APP sur trois sites différents γ , ζ et ϵ , qui varient en fonction de la composition du complexe γ -sécrétase et donc de son activité, ou de l'épaisseur de la membrane où se situe la γ -sécrétase, conduisant ainsi à la

formation de peptides amyloïdes de différentes longueurs. En plus du clivage classique au site γ qui génère les $A\beta_{x-40}$ et $A\beta_{x-42}$, le clivage au site ϵ produit des $A\beta_{x-48}$ et $A\beta_{x-49}$ et celui au site ζ donne des $A\beta_{x-45}$ et $A\beta_{x-46}$. Les clivages peuvent se produire les uns à la suite des autres d' ϵ à γ pour former des $A\beta_{x-38}$ et $A\beta_{x-43}$. (Sato *et al.* 2005, Takami *et al.* 2009). Ces différents clivages mènent à la production de différents peptides amyloïdes mais aussi de différents AICDs : C50, C53, C57 et C59 (Sato *et al.* 2003).

La formation du complexe de la γ -sécrétase suit un processus d'assemblage séquentiel spécifique. L'hypothèse principalement rencontrée dans la littérature indique qu'un premier complexe se forme entre la Nicastrine et l'APH1 (donc deux précomplexes possibles : Nicastrine-Aph1A ou Nicastrine-Aph1B) (LaVoie *et al.* 2003, Shirotani *et al.* 2004). Ensuite, s'arrimerait à ce précomplexe la préséniline 1 ou la préséniline 2 (donc quatre complexes possibles : Nicastrine-Aph1A-PS1, Nicastrine-Aph1A-PS2, Nicastrine-Aph1B-PS1 ou Nicastrine-Aph1B-PS2) et enfin PEN2 se joindrait au complexe et entrainerait l'endoprotéolyse activatrice de la préséniline (Takasugi *et al.* 2003, Niimura *et al.* 2005). Une version alternative existe, où après la formation du précomplexe Nicastrine-Aph1 il y aurait formation d'un complexe PS-PEN2 qui s'arrimerait au premier complexe (Fraering *et al.* 2004a). Aussi, s'il existe 4 complexes de la γ -sécrétase différents (De Strooper *et al.* 2003) et que les présénilines portent l'activité γ -sécrétase à elles seules (Ahn *et al.* 2010a), cette sécrétase doit être obligatoirement constituée d'un complexe de 4 protéases pour fonctionner, celles-ci interagissant ensemble et se modulant les unes les autres (Fig.14) (Takasugi *et al.* 2003, Kaether *et al.* 2004).

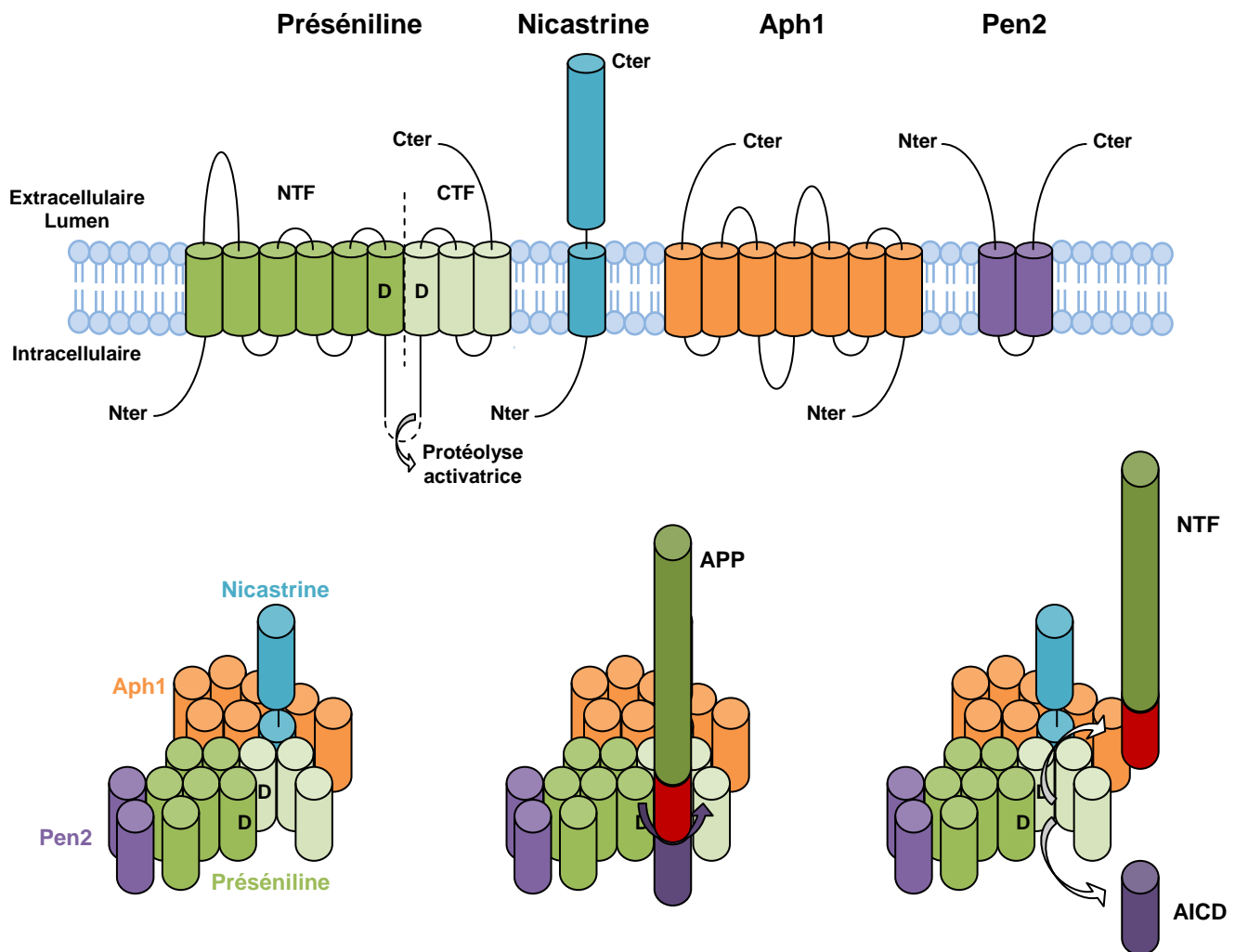


Figure 14. Représentation du complexe de la γ -sécrétase et de ses différents constituants. La préséniline nécessite un clivage protéolytique pour se dimériser et être active. Est aussi représentée la conformation spatiale du complexe de la γ -sécrétase et son action catalytique sur l'APP au niveau de la membrane plasmique et des endosomes essentiellement. D'après De Strooper et al. 2012

La Nicastrine est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 130kDa avec un très long domaine extracellulaire fortement glycosylé (Fig.14) (Shirotani *et al.* 2003). Les glycosylations sont capitales pour la bonne conformation du domaine extracellulaire permettant la formation et la maturation du complexe de la γ -sécrétase et de son activité. Ce domaine permet aussi de se lier à d'autres protéines possédant un domaine extracellulaire comme l'APP et peut-être servir de récepteur pour la γ -sécrétase (Shirotani *et al.* 2003, Shah *et al.* 2005).

L'Aph1 est une protéine de 30kDa possédant 7 domaines transmembranaires, une partie N-terminale intracellulaire et une partie C-terminale extracellulaire (Fig.14) (fortna *et al.* 2004). L'Aph1 interagit avec la Nicastrine via plusieurs de ses domaines transmembranaires et forment un précomplexe au niveau du réticulum endoplasmique pour ensuite être maturé dans le Golgi (Takasugi *et al.* 2003). Le 4^e domaine transmembranaire d'Aph1 peut se lier à celui des présénilines et de PEN2 via un motif conservé GxxxG (Lee *et al.* 2004, Araki *et al.* 2006). Il existe deux isoformes d'Aph1, Aph1A et Aph1B, issues de l'épissage alternatif du gène APH1.

Les présénilines sont des protéines transmembranaires de 50kDa possédant initialement 9 domaines transmembranaires, une partie C-terminale extracellulaire et une partie N-terminale intracellulaire (Fig.14) (Laudon *et al.* 2005). Lors de leur maturation, ces présénilines subissent un clivage, probablement autocatalytique (Fukumori *et al.* 2010), au niveau de deux aspartates (257 et 385) de leur boucle cytoplasmique entre le 6^e et le 7^e domaine transmembranaire. Ce clivage libère deux fragments : un fragment C-terminal de 20kDa et un fragment N-terminal de 30kDa s'hétérodimérisant, donnant ainsi la conformation active des présénilines (Thinakaran *et al.* 1996, Tolia *et al.* 2006). La mutation d'un des deux aspartates de la boucle cytoplasmique suffit à empêcher l'activation des présénilines (Wolfe *et al.* 1999b, Sato *et al.* 2006). Il existe deux isoformes des présénilines, PS1 et PS2 partageant 67% d'homologie. Alors que le site d'interaction de PS1 et PEN2 se situe sur son 4^e domaine transmembranaire, le site d'interaction avec la Nicastrine est localisé au niveau de sa partie C-terminale (Watanabe *et al.* 2005, Capell *et al.* 2003).

Enfin, PEN2 est une protéine de 12kDa possédant deux domaines transmembranaires et dont les deux extrémités sont extracellulaires (Fig.14) (Takasugi *et al.* 2003). Ces domaines extracellulaires permettraient à PEN2 d'interagir avec les présénilines mais aussi de réguler leur endoprotéolyse (Crystal *et al.* 2003, Luo *et al.* 2003).

4. Étiologie et processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer

Si toutes les formes de maladie d'Alzheimer présentent les mêmes symptômes cliniques, l'âge d'apparition de la pathologie, sa vitesse de progression et la présence ou non d'antécédents familiaux subdivise la maladie d'Alzheimer en deux catégories : les formes précoces apparaissant entre 30 et 60ans et les formes tardives débutant après 60ans. L'étude approfondie des différentes formes de maladie d'Alzheimer a permis progressivement de proposer un processus physiopathologique de cette maladie complexe et d'identifier les différents acteurs y participant.

4.A. Gènes responsables des formes familiales

Très rapidement afin de mieux comprendre le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer, ont été étudiées les formes monogéniques de la maladie d'Alzheimer. En effet ces formes précoces caractérisées par la présence de nombreux antécédents familiaux sont moins complexes à étudier que les formes sporadiques influencées par de nombreux facteurs environnementaux. Parmi ces formes précoces, certaines sont transmises de façon autosomique dominante. Les formes avec transmission autosomique dominante sont toutes caractérisées par la présence d'une mutation d'un des trois gènes impliqués dans la voie amyloïdogène, voie responsable de la formation des A β . Une seule mutation est suffisante pour déclencher précocement la pathologie. Il existe actuellement 230 mutations connues sur le gène de l'APP et des présénilines PS1et PS2 (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations). Alors que les formes familiales de la maladie d'Alzheimer présentent moins de 1% des cas cliniques, les hypothèses sur la physiopathologie ainsi que les modèles animaux sont quasiment tous basés sur l'étude de ces formes minoritaires.

Dans une des premières études à s'intéresser à la génétique de la maladie d'Alzheimer, les auteurs se sont penchés sur la proportion de patients atteints de trisomie 21 (syndrome de Down) présentant des symptômes et une neuropathie (présence de dépôts amyloïdes) similaires à ceux d'une maladie d'Alzheimer. En croisant ces observations avec l'étude génétique de quatre familles ayant des formes autosomales dominantes de la maladie d'Alzheimer, leur conclusion a suggéré que le

triplet de chromosome 21 trahit la présence d'un gène susceptible d'être lié à la maladie d'Alzheimer, localisé au niveau des loci 21q11.2 et 21q22.2 et incluant le gène de l'APP (Schweber *et al.* 1985, St George-Hyslop *et al.* 1987). L'étude des cas familiaux de maladie d'Alzheimer et le séquençage de leur gène APP a permis de mettre en évidence de nombreuses mutations sur le gène de l'APP (Hardy *et al.* 1992). Trente-trois mutations ont pour l'instant été mises en évidence pour ce gène dont 75% sont des mutations ponctuelles le reste étant essentiellement des duplications (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations). La majorité de ces mutations sont responsables d'une augmentation de production des A β et plus particulièrement de l'A β 42 en modifiant le rapport A β 40/A β 42 (Selkoe *et al.* 1997, Guerreiro *et al.* 2010, Jonsson *et al.* 2012). Ces formes s'agrégeant plus facilement, il en résulte une augmentation de la formation des dépôts amyloïdes.

Au final, les mutations du gène de l'APP ne représentent que 15 à 20% des cas familiaux de maladie d'Alzheimer. Plusieurs études de liaison ont mis en évidence deux autres loci : le premier en 14q24 correspondant au gène de la préséniline 1 ou PS1 et le second en 1q42.13 correspondant au gène PS2 (Selkoe *et al.* 1997, Walker *et al.* 2005). Ainsi, les 185 mutations répertoriées pour la PS1 correspondent à 75 à 80% des formes familiales de la maladie d'Alzheimer contre 5% des cas pour les 13 mutations connues de la PS2 (Campion *et al.* 1999, Bekris *et al.* 2010). La majorité des mutations sur les gènes PS1 et PS2 sont ponctuelles mais certaines mutations conduisent à des délétions ou des insertions (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations). La PS1 et la PS2 sont les sous-unités catalytiques de la γ -sécrétase, responsable de la protéolyse de l'APP en A β . La majorité des mutations sur ces présénilines conduit à une augmentation de leur capacité de clivage de l'APP en A β et plus favorablement en A β 42 (Walker *et al.* 2005, Castellani *et al.* 2008).

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la voie amyloïdogène est impactée et conduit à la surproduction de peptides amyloïdes. Dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer,

4.B. L'hypothèse de la cascade amyloïde

La première hypothèse tentant d'harmoniser les observations sur la maladie d'Alzheimer et ainsi en déduire un processus physiopathologique repose sur différents résultats :

A – Comme décrit précédemment, l'étude des formes monogéniques à transmission autosomique dominante de la maladie d'Alzheimer a permis de mettre en évidence qu'une seule mutation sur les gènes APP, PS1 et PS2 suffit à déclencher la pathologie comprenant les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. Ces mutations ont été, la plupart du temps, associées à une augmentation de la production des peptides amyloïdes et plus particulièrement des $A\beta_{x-42}$ (Hutton *et al.* 1997, Walker *et al.* 2005). Ces mutations sur les gènes de l'APP, PS1 ou PS2 favorisent la voie amyloïdogène en augmentant soit: (1) la production d'APP et donc de substrat disponible pour les sécrétase, (2) les sites de clivages préférentiels disponible sur l'APP ou encore (3) l'activité de la γ -sécrétase et sa propension à produire des $A\beta_{x-42}$ (Corder *et al.* 1993, Sherrington *et al.* 1995, Jankowsky *et al.* 2004).

B - Les patients atteints du syndrome de Down développent une pathologie de type Alzheimer provenant de l'augmentation du nombre de copies du gène de l'APP due à la trisomie 21.

C - Les dépôts amyloïdes sont suspectés d'être neurotoxiques et participeraient à l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires.

Cette hypothèse datant de 1992 stipule que, suite aux mutations entraînant une augmentation de leur production et de leur sécrétion, les peptides amyloïdes s'accumuleraient dans le parenchyme cérébral. Leur fort pouvoir d'agrégation favoriserait leur oligomérisation puis leur fibrillation et enfin la formation de plaques. Ces plaques neurotoxiques, provoqueraient alors un stress oxydatif important pour les neurones environnants conduisant à l'apparition de dysfonctionnements cellulaires, à l'hyperphosphorylation de Tau et donc à la dégénérescence neurofibrillaire et enfin à la mort neuronale (Hardy, 1992).

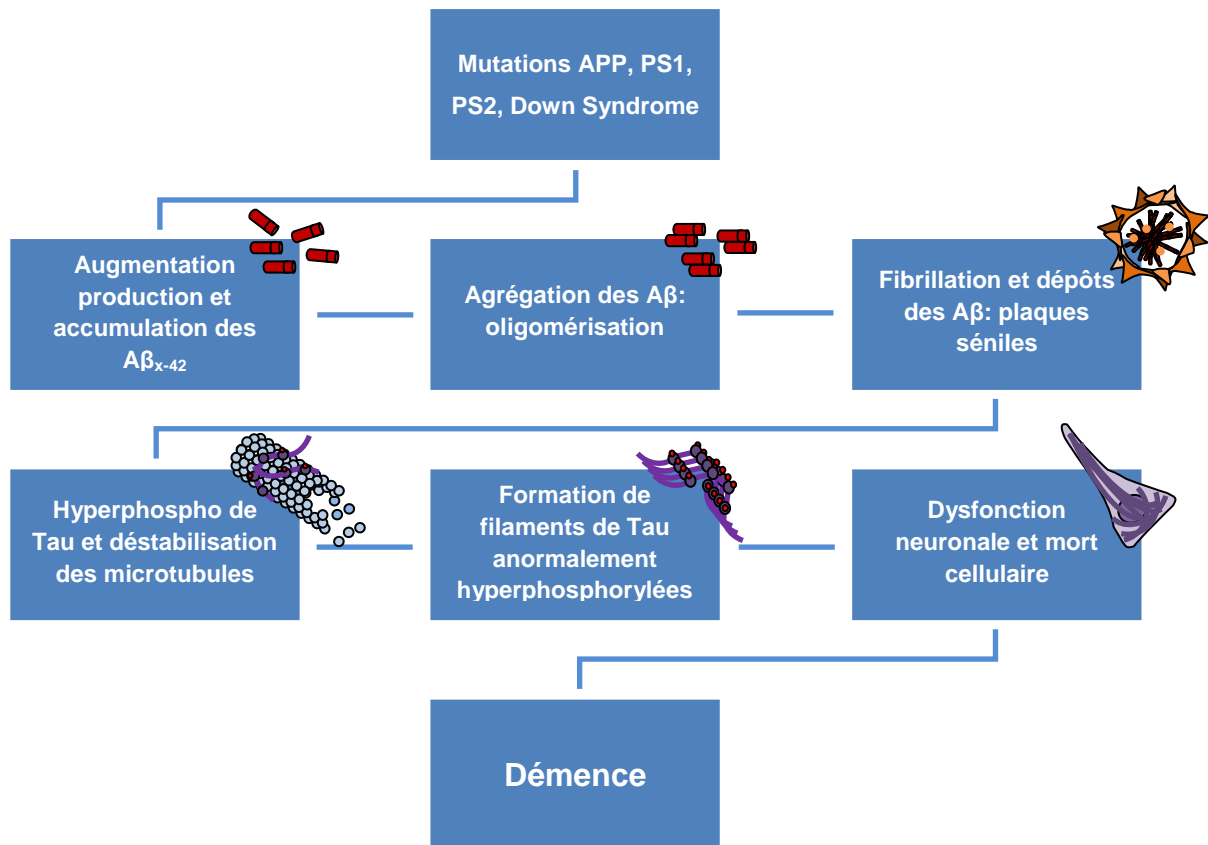


Figure 15. Hypothèse initiale de la cascade amyloïde. Une séquence d'événements spécifiques partant d'une mutation du gène de l'APP, PS1 ou PS2 conduit progressivement à la démence de type Alzheimer. D'après Hardy, 1992

Depuis son élaboration, de nombreux travaux et observations sont venus appuyer ou infirmer cette hypothèse. Le chapitre suivant résume une partie seulement de ses hypothèses et montre comment ces nouvelles informations sont venues étoffer l'hypothèse de J.Hardy pour prendre en compte les nouvelles voies potentiellement impliquées dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

4.C. Une hypothèse incomplète

Parmi les observations n'appuyant pas cette hypothèse, les études comparatives montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre la quantité de dépôts amyloïdes et la sévérité de la maladie d'Alzheimer ce qui est pourtant le cas pour les dégénérescences neurofibrillaires (Nagy *et al.* 1996, Delacourte *et al.* 1999, Giannakopoulos *et al.* 2003). De plus, 85% de la mort neuronale constatée peu être imputé à la dégénérescence neurofibrillaire (Giannakopoulos *et al.* 2003). La topographie des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires sont inégales dans plusieurs régions cérébrales. La majorité des modèles cellulaires et

animaux surexprimant de l'APP muté et/ou de la PS1 mutée, ont certes une forte augmentation de production de peptides amyloïdes et la formation de dépôts amyloïdes, mais ne montrent pas de dégénérescences neurofibrillaires et la perte neuronale est faible. L'exception provient des modèles de primates où il a été montré que l'injection intracérébrale d'Aβ fibrillaire synthétique provoque une augmentation de la phosphorylation de Tau, une perte neuronale importante et une prolifération microgliale seulement chez les macaques rhésus âgés (Geula *et al.* 1998). Il se pourrait donc que les échecs constatés dans les modèles murins proviennent en partie du fait que la susceptibilité à la neurotoxicité des Aβ augmente avec la longévité du modèle étudié ou dépendent de facteurs spécifiques aux primates et aux humains. Ainsi, ces différentes observations ont conduit de nombreux auteurs à proposer l'hypothèse d'un rôle primordial de la pathologie Tau dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer (Delacourte *et al.* 2002, Giannakopoulos *et al.* 2003, Bretteville et Planel, 2008).

Cependant, de nombreuses études viennent appuyer la théorie de la cascade amyloïde :

Les mutations du gène de Tau

S'il existe de nombreuses mutations sur le gène MAPT codant pour la protéine Tau, celles-ci ne déclenchent pas la maladie d'Alzheimer et sont uniquement liées à la démence fronto-temporale (FTDP-17) (Hutton *et al.* 1998). Ces mutations accélèrent la formation de filaments Tau et génèrent une dégénérescence neurofibrillaire importante observables dans les modèles *in vivo* comme par exemple les souris surexprimant Tau P³⁰¹L (Götz *et al.* 2001a). Ces souris ne présentent aucune pathologie de type amyloïde.

L'Injection d'Aβ intracérébrale augmente les DNF

Chez les souris Tau P³⁰¹L, l'injection par stéréotaxie au niveau de leur cortex somatosensoriel et de leur hippocampe (région CA1) de fibrilles synthétiques d'Aβ_{x-42} augmente la quantité de dégénérescences neurofibrillaires observées d'un facteur 5 au niveau de l'amygdale (Götz *et al.* 2001b) par rapport aux souris contrôle. Il est observé dans les souris doubles transgéniques issues d'un croisement de souris Tau P³⁰¹L avec des souris Tg2576 surexprimant un APPswedish (APP portant une double mutation K670N et M671L retrouver dans des formes familiales de la maladie

d'Alzheimer en Suède ([Mullan et al. 1992](#)), une forte augmentation d'un facteur 7 de la quantité de dégénérescences neurofibrillaires au niveau du bulbe olfactif, de l'amygdale et du cortex entorhinal par rapport aux souris Tau P³⁰¹L ([Lewis et al. 2001](#)).

Les dépôts amyloïdes seraient antérieurs aux DNFs

Si un résultat similaire a été retrouvé chez les souris triples transgéniques surexprimant Tau P³⁰¹L, l'APP^{swe} et une PS1 mutée en M¹⁴⁶V, l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires est postérieure à celle des dépôts amyloïdes ([Oddo et al. 2003](#)). Cette susceptibilité de Tau aux A β _{x-42} semble spécifique à certaines régions cérébrales comme l'amygdale et certains gènes pourraient être impliqués dans ces mécanismes ([Ziringer et al. 2001](#)).

Les traitements aux A β favorisent l'hyperphosphorylation de Tau

1) Bien que ces études aient permis d'établir un lien entre les deux lésions principales de la maladie d'Alzheimer, le mécanisme reliant les A β à Tau est encore débattu. Il a été montré récemment que l'A β , en se liant potentiellement à un récepteur encore non identifié, pourrait entraîner une activation par phosphorylation de la protéine Fyn (Src kinase). Fyn pourrait alors moduler l'activité du récepteur NMDA par l'intermédiaire de la protéine Tau. Un niveau élevé d'A β et de protéines Tau hyperphosphorylées entraînerait une diminution de l'activité du récepteur NMDA conduisant à une diminution de la potentialisation à long terme, une augmentation de l'excitotoxicité et une perturbation de la plasticité synaptique ([Ittner et al. 2010](#), [Mondragon-Rodriguez et al. 2012](#), [Boehm et al. 2013](#)).

2) Il a été montré qu'un traitement avec des oligomères d'A β _{x-42} peuvent augmenter l'expression de l'AK1 (Adénylate Kinase 1) ce qui réduirait la phosphorylation inhibitrice de l'AMPK (AMP Kinase) perturbant ainsi son activité ([Park et al. 2012](#)). Enfin la dérégulation de l'AMPK entraînerait une baisse de phosphorylation inhibitrice de la GSK3 β , une des principales kinases de Tau. Au final la GSK3 β favoriserait une hyperphosphorylation de Tau conduisant à la dégénérescence neurofibrillaire ([Tomiya et al. 2010](#), [Park et al. 2012](#)).

3) D'un autre côté, il a été montré que Cdk5 (Cyclin-Depend Kinase 5) est une des kinases de Tau en partie responsable de son hyperphosphorylation (due notamment aux nombreux sites de phosphorylation liés à la Cdk5 sur la protéine Tau) ([Lund et](#)

al. 2001). L'extinction de son expression par ARN interférant conduit à une diminution de la quantité de dégénérescences neurofibrillaires observée dans le cerveau de souris C57bl/6 sauvages (wt) (Piedrahita *et al.* 2010). L'exposition aux A β augmenterait la concentration de calcium Ca²⁺ intraneuronale conduisant à la formation de complexe Cdk5/p25 hyperactifs. Ces complexes sont responsables d'une hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau et d'une forte neurodégénérescence (Ahlijanian *et al.* 2000, Noble *et al.* 2003).

La mutation protectrice du gène de l'APP

Récemment une nouvelle mutation a été découverte sur le gène de l'APP. La mutation A673T semble protectrice contre le développement de la maladie d'Alzheimer (Jonsson *et al.* 2012). Il a été montré que cette mutation diminuerait le clivage de l'APP par BACE1 sans changer son affinité avec cette dernière, réduisant ainsi la production de peptides amyloïdes et en particulier l'A β ₄₂ (Maloney *et al.* 2014).

Finalement, le principal défaut de la cascade amyloïde réside dans la base de cette hypothèse. Cette hypothèse a été émise à partir d'observations menées sur les formes familiales de la maladie d'Alzheimer à transmission autosomique dominante et donc sur des processus physiopathologiques découlant uniquement de mutations sur le gène de l'APP ou des présénilines. Si cette hypothèse semble valable pour 1% des cas de maladie d'Alzheimer, qu'en est-il pour 99% des autres cas ? C'est pourquoi l'étude des formes sporadiques plus tardives apparaissant en général après 60ans et résultant d'un mélange de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux est particulièrement importante pour mieux comprendre le processus physiopathologique de cette maladie complexe.

4.D. Formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer et facteurs de risques

Contrairement aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer, un grand nombre de facteurs interagissant entre eux influencent les formes sporadiques. C'est la caractéristique principale d'une maladie multifactorielle : une intrication de facteurs environnementaux et de facteurs génétiques, ou gènes de susceptibilités. Aussi, la part de risque de développer la maladie d'Alzheimer attribuable aux facteurs

environnementaux est établie entre 20 et 40% contre 60 et 80% pour les risques génétiques ([Gatz et al. 2006](#)).

4.D.1. Facteurs de risques « environnementaux » de la maladie d'Alzheimer

4.D.1.a. Mode de vie et environnement social

L'isolement progressif des personnes atteintes de maladies d'Alzheimer (institutionnalisation, départ du domicile, éloignement familial) contribue à une apparition plus précoce des troubles et à leur aggravation. Ainsi après 80ans, un patient sur trois institutionnalisé est atteint de pertes de mémoire ou de désorientations temporo-spatiales contre un sur dix restant à domicile et gardant des liens sociaux (famille, amis...), être seul augmentant de 60% le risque de développer la pathologie ([Fratiglioni et al. 2000](#)). Les études prospectives montrent que globalement, toutes activités, qu'elles soient physiques (jardinage, bricolage, voyages...) ou intellectuelles (apprentissage, lecture, jeux...) nécessitant une planification, une organisation et une mémorisation des tâches, semblent limiter les risques de maladie d'Alzheimer ([Frabrigoule et al. 1995](#), [Fratiglioni et al. 2004](#)).

Le niveau d'étude, le faible niveau de revenu et le type d'activité professionnel (métiers intellectuels/métiers manuels) semblent impacter également sur le développement de la pathologie. L'éducation est un marqueur de la réserve cognitive. Si un niveau d'éducation peu élevé et/ou une profession intellectuellement peu stimulante pourraient favoriser une apparition précoce de la maladie d'Alzheimer, à l'inverse, un haut niveau d'étude et/ou une profession intellectuelle stimulante renforceraient cette réserve cognitive reculant l'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer ([Stern et al. 1994](#), [Ngandu et al. 2007](#)). Cet effet serait également visible même chez les individus possédant un fond génétique défavorable (par exemple l'allèle $\epsilon 4$ de l'APOE) ([Wang et al. 2012](#), [Ferrari et al. 2014](#)). Cependant si ces études démontrent un réel effet sur l'âge d'apparition de la pathologie, l'éducation ne semblerait pas impacter le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer ([EClipSE et al. 2010](#), ou potentiellement imiterait la Tauopathie pour [Soldan et al. 2013](#)).

4.D.1.b. Facteurs de risques vasculaires et métaboliques

4.D.1.b.1. Maladies cérébrovasculaires

Si le lien entre démences vasculaires et maladies cérébrovasculaires est établi dans la littérature, la relation entre la maladie d'Alzheimer et ces maladies cérébrovasculaires n'a été que très récemment mise en évidence ([Qiu et al. 2011](#), [Kling et al. 2013](#)). Parmi ces maladies sont retrouvées les Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC), les ischémies cérébrales ou encore l'athérosclérose.

Le facteur de risque le plus important et commun à ces maladies cérébrovasculaires est l'hypertension. L'hypertension chronique est la cause de lésions vasculaires importantes tant au niveau périphérique que central. Au niveau du cerveau, cette hypertension peut entraîner des AVCs, des micro-hémorragies ou encore des lésions de la matière blanche conduisant à l'apparition de problèmes cognitifs ([Lammie et al. 2002](#), [Firbank et al. 2007](#)). Aussi des études épidémiologiques ont pu montrer que les patients atteints de démences présentent une pression artérielle plus élevée que les témoins ([Stewart et al. 2009](#)). Dans le cas des patients atteints de maladie d'Alzheimer, les lésions de type athérogéniques, issues en partie d'une hypertension chronique importante, sont plus nombreuses que les individus non malades ou présentant une autre forme de maladie neurodégénérative ([Yarchoan et al. 2012](#)).

L'hypertension artérielle fragilise la barrière hémato-encéphalique au niveau des capillaires cérébraux. Ces micro lésions endommageraient progressivement les zones cérébrales les plus sensibles conduisant à une dégénérescence des synapses, à l'apoptose neuronale et à une augmentation de l'accumulation d'A β ([Perlmutter et al. 1991](#), [Deanes et al. 2004](#)). L'induction de l'hypertension dans des modèles de souris conduit à une augmentation de la pathologie amyloïde et à une détérioration de la barrière hémato-encéphalique au niveau de leur Cortex et de leur Hyppocampe ([Gentile et al. 2009](#)). Aussi, dans un très récent papier présentant un modèle d'hypertension réalisé chez des souris APP/PS1, il a été constaté une diminution du réseau de capillaires cérébraux de près de 25% liée à une augmentation de près de 40% des dépôts amyloïdes cérébro-vasculaires ([Cifuentes et al. 2015](#)). Enfin, l'hypertension chez le rat âgé conduisait à une diminution de

l'expression du gène MAPT codant pour la protéine Tau, ainsi que les gènes codants pour les protéines de liaison à l'APP (Csiszar *et al.* 2013).

Dans le cas des ischémies cérébrales, conduisant à des lésions plus ou moins sévères des régions cérébrales mémorielles comme l'hippocampe ou le thalamus, l'hypertension ne serait pas le seul facteur exacerbant les lésions liées à la maladie d'Alzheimer. En effet, une sur-expression de CDK5 liée à une augmentation de l'apoptose neuronale est retrouvée dans les cas d'ischémies cérébrales (Wen *et al.* 2007). Cette protéine est impliquée dans la synaptogenèse et la plasticité synaptique, et pourrait favoriser la formation des DNFs en participant à l'hyperphosphorylation anormale de Tau (Baumann *et al.* 1993, Piedrahita *et al.* 2010).

4.D.1.b.2. Hyperinsulinémie et Diabète de type II

De nombreuses études indiquent un lien important entre la maladie d'Alzheimer et les dysfonctions dans la voie de l'insuline (Craft and Watson *et al.* 2004, De La Monte *et al.* 2009). Par exemple, l'hyperglycémie, l'intolérance au glucose, l'insulino-resistance et une sécrétion d'insuline défailante seraient toutes liées à l'augmentation du risque de développer une maladie d'Alzheimer (Luchsinger *et al.* 2004, Crane *et al.* 2013a). Aussi, les patients atteints de maladie d'Alzheimer présenteraient des concentrations d'insuline plus basses que les témoins du même âge non-malades (Craft and Watson *et al.* 2004).

L'insuline est une hormone impliquée principalement dans le métabolisme énergénétique et produite par les cellules β des îlots de Langerhans au niveau du pancréas. Bien que périphérique, cette hormone peut traverser la BHE grâce à un transporteur actif saturable (Banks *et al.* 1997, Cholerton *et al.* 2013). Il semblerait également que l'insuline puisse être produite directement au niveau des neurones (Ghasemi *et al.* 2013). Au niveau cérébral l'insuline se lie à son récepteur, l'IR (Insuline Receptor) et conduit à de nombreux effets comme la régulation de l'homéostasie énergétique, la survie neuronale, ainsi que les processus d'apprentissage et de mémorisation (Plum *et al.* 2005, Freude *et al.* 2009). La fixation de l'insuline à son récepteur conduit à une cascade de phosphorylations activatrices impliquant deux voies importantes : (1) la voie PI3K/Akt (Phosphoinositide 3-kinase/protéine kinase B) impliquée dans la plasticité synaptique, la consolidation de

la mémoire (Horwood *et al.* 2006), les pertes de mémoires induites par les A β (Chiang *et al.* 2010) et la synthèse d'oxide nitrique (NO) (Calabrese *et al.* 2007) et (2) la voie des MAPK (Mitogen-activated protéin kinase) impliquée dans la régulation de l'expression de gènes liés à la croissance, à la prolifération, à la maintenance et à la réparation neuronale et synaptique particulièrement au niveau de l'hippocampe (Akter *et al.* 2011). Le récepteur à l'insuline et ses substrats les IRS1 à 4 (Insulin Receptor Substrate) sont localisés principalement au niveau du bulbe olfactif et de l'hypothalamus, ainsi que dans l'hippocampe et le cortex cérébral, deux zones particulièrement touchées dans la maladie d'Alzheimer (Plum *et al.* 2005, Freude *et al.* 2009). De part sa localisation, celle de son récepteur et ses différentes implications, l'insuline est une hormone importante pour les processus d'apprentissage et de mémorisation et est donc une cible majeure dans le cadre de la maladie d'Alzheimer.

L'insulino-resistance, la réduction du nombre et de l'activité des récepteurs à l'insuline et leurs impacts sur la survie neuronale et la plasticité synaptique observés post-mortem dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, sont maintenant considérés comme des anomalies faisant partie intégrante de cette pathologie (Rivera *et al.* 2005, Talbot *et al.* 2012). Il a été constaté qu'une hyperinsulinémie périphérique prolongée entraînerait une régulation négative des récepteurs à l'insuline au niveau de la BHE et à leur internalisation conduisant ainsi à une réduction du transport de l'insuline dans le cerveau (Wallum *et al.* 1987, Talbot *et al.* 2012). Cette insulino-resistance progressive impacterait et dérégulerait le métabolisme du glucose cérébral. Ceci entraînerait une production accrue d'AGEs (Advanced Glycation End-products) dérivés les plus délétères du glucose qui participeraient et faciliteraient l'aggrégation des peptides amyloïdes en plaques séniles et interviendraient dans la formation des dégénérescences neurofibrillaires (Kroner *et al.* 2009, Correia *et al.* 2012). Il a également été montré que les dysfonctions au niveau de la voie de l'insuline et de son récepteur sont corrélées à l'hyperphosphorylation de Tau neuronale (Erol *et al.* 2008). Enfin, Il semblerait qu'une hyperinsulinémie prolongée contribue à diminuer la clairance des A β . En effet, l'insuline et les A β entrent en compétition pour la même protéase, l'IDE (Insulin Degrading Enzyme), responsable de la clairance des A β (Holroyd *et al.* 2003, Farris *et al.* 2003). Ainsi dans un modèle de souris IDE $-/-$ (délétion homozygote du gène

IDE), en plus d'une hyperinsulinémie et d'une intolérance au glucose attendues, les auteurs ont constaté une diminution de près de 50% de la dégradation d'A β endogène conduisant à leur accumulation dans le cerveau (Farris *et al.* 2003). Ho et ses collaborateurs ont également pu montrer dans un modèle de souris APP/PS1 présentant une hyperinsulinémie induite par un régime spécifique, une diminution de la concentration d'IDE et une augmentation de l'accumulation des A β (Ho *et al.* 2004). Enfin s'il a été montré qu'une hyperinsulinémie prolongée est délétère et nocive en favorisant l'accumulation des A β , l'injection d'insuline ou d'IGF-1 (Insulin Growth Factor 1) entraînerait une diminution de toxicité des oligomères d'A β *in vivo* (Carro *et al.* 2002).

L'insulino-résistance et une perturbation de la voie de l'insuline sont les facteurs communs majeurs entre la maladie d'Alzheimer et le diabète de type II. Différentes études de population ont pu mettre en évidence une augmentation de 65% du risque de développer une maladie d'Alzheimer chez les patients présentant un diabète (Arvanitakis *et al.* 2004, Janson *et al.* 2014). Le diabète de type II est caractérisé par une hyperglycémie liée à une insulino résistance résultant de dysfonctions au niveau des cellules β pancréatique puis se généralisant à l'ensemble de la périphérie et au système nerveux central (Correia *et al.* 2012). De part les altérations de fonctions et de structures constatées au niveau du système nerveux central chez les patients atteints de diabète de type II chronique, ce diabète est considéré comme un facteur de risque important pour les démences, maladie d'Alzheimer incluse (Jellinger *et al.* 2008). Chez l'humain comme chez la souris, le taux d'insuline cérébral est inversement corrélé à l'accumulation d'A β et aux stades de Braak (Carro *et al.* 2002, Jolivald *et al.* 2008). Si l'insulino-résistance cérébrale conduit à une réduction de la clairance des A β et donc à leur accumulation, il semblerait également que les A β soient capable d'induire une diminution du nombre de récepteurs à l'insuline présents à la surface des neurones et nécessaires au métabolisme glucidique (De Felice *et al.* 2009) favorisant ainsi l'insulino-résistance cérébrale. D'autres anomalies communes à la maladie d'Alzheimer et au diabète de type II sont aussi retrouvées telles que la dérégulation du métabolisme du glucose, l'augmentation du stress oxydatif lié à des dysfonctions mitochondriales ou encore la présence de dépôts amyloïdes (Correia *et al.* 2012). Aussi, les nombreuses similarités entre la maladie d'Alzheimer et le diabète de type II ont permis

l'élaboration d'une hypothèse stipulant que la maladie d'Alzheimer serait une forme de diabète de type II cérébral ou diabète de type III (Steen *et al.* 2005, De La Monte *et al.* 2012). Cette hypothèse est cependant contestée pour plusieurs raisons : (1) l'hyperglycémie présente chez les patients atteints de diabète de type II n'est pas retrouvée dans le liquide cérébro-spinal des patients atteints de maladie d'Alzheimer et (2) si une insulino-résistance est constatée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'insulino-déficience cérébrale n'a pour l'instant pas été démontrée (Talbot et Wang, 2014).

4.D.1.b.3. Dyslipidémie et obésité

L'hypercholestérolémie (haut niveau de cholestérol mesuré dans le plasma) est aussi un facteur de risque de la pathologie Alzheimer (Kivipelto *et al.* 2001, Reitz *et al.* 2011). Des gènes impliqués dans la régulation et le transport du cholestérol dont l'APOE, la CLU (APOJ) ou encore SORL1, sont directement liés à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer. Ce cholestérol pourrait intervenir dans la maladie d'Alzheimer par deux mécanismes différents. D'une part, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque de l'athérosclérose directement impliquée dans les maladies cérébrovasculaires et facteur de risque vasculaire important dans la maladie d'Alzheimer comme décrit précédemment. D'autre part, l'hypercholestérolémie pourrait changer la composition des radeaux lipidiques, éléments centraux du métabolisme de l'APP contenant les β et γ sécrétases et favoriserait une augmentation de l'activité de ces sécrétase et donc une augmentation de la production d'A β (Fassbender *et al.* 2001, Korade *et al.* 2008, Rushworth *et al.* 2010).

Lié à l'hypercholestérolémie, l'obésité est un facteur de risque important de la maladie d'Alzheimer (Witmer *et al.* 2008, Tolppanen *et al.* 2014). En plus de l'hypercholestérolémie, une forte adiposité favorise l'insulino-résistance, la production d'AGEs délétères et une inflammation conduisant à une augmentation du stress oxydatif du à la production de ROS (Luchsinger *et al.* 2009). Ces quatre marqueurs de l'obésité, directement impliqués dans la régulation de la production ou de la clairance des peptides amyloïdes, sont tous associés à une augmentation du facteur de risque de développer la maladie d'Alzheimer. Autre élément important de

l'obésité, la leptine est une adipokine jouant un rôle central dans l'homéostasie, le stockage et la mobilisation des lipides. Cette hormone pourrait voir son métabolisme impacté négativement dans la maladie d'Alzheimer. Outre la corrélation entre un haut niveau de leptine circulante et une réduction du risque de développer cette maladie (Lieb *et al.* 2009), la leptine pourrait directement et indirectement influencer la cascade amyloïde. En modifiant la composition en lipides des radeaux, la leptine diminuerait l'activité de la β -sécrétase, réduisant donc la production d'A β et augmenterait la formation de complexe APOE-A β ce qui faciliterait la clairance des peptides amyloïdes (Fewlass *et al.* 2004). Enfin, cette adipokine inhiberait la GSK3 β en favorisant sa phosphorylation limitant ainsi l'hyperphosphorylation de Tau (Greco *et al.* 2008 et 2009). C'est pourquoi certains auteurs s'accordent à dire que la maladie d'Alzheimer pourrait être aussi une pathologie liée à un désordre métabolique (Merlo *et al.* 2010). De manière intéressante, la relation entre le poids, ici l'obésité, et la maladie d'Alzheimer s'inverserait dans les années précédant la démence. Ceci serait dû à une baisse de poids liée à un défaut de nutrition ou une malnutrition apparaissant juste avant la démence (Gustafson *et al.* 2009).

4.D.1.c. Stress oxydatif

La mitochondrie est un organite central dans la production et la régulation de l'énergie dans la cellule. De nombreuses pathologies, dont la maladie d'Alzheimer, sont issues ou présentent une altération du fonctionnement mitochondrial avec pour principal effet une augmentation du stress oxydatif en une perturbation importante du métabolisme énergétique (Pathak *et al.* 2013). Ce stress oxydatif conduit à la perturbation du fonctionnement voire à la mort cellulaire. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, plusieurs voies entraînent l'augmentation du stress oxydatif.

L'inflammation consécutive à la formation des dépôts amyloïdes, à la mort neuronale ou aux lésions de la BHE favorise l'augmentation du stress oxydatif. La perturbation du métabolisme glucidique par l'insulino-résistance et par la dyslipidémie (liée à l'hyperinsulinémie ou un défaut dans le transport lipidique) entraînerait une dérégulation progressive de la fonction mitochondriale. Les mitochondries étant elles-mêmes une source majeure de production de ROS, leur dérégulation conduit à la production augmentée de ROS et donc du stress oxydatif.

qui amplifie le dysfonctionnement des mitochondries (Rocha *et al.* 2010). L'accumulation de peptides amyloïdes génère un stress oxydatif important pour les neurones et témoigne d'une altération mitochondriale.

La sur-expression de l'APP et l'augmentation du stress oxydatif provoquent une accumulation d'A β dans les lysosomes associée à une augmentation de l'apoptose (Zheng *et al.* 2009). Cette accumulation d'A β peut perturber directement et indirectement les fonctions mitochondriales. Normalement, les A β sont acheminés au travers de la membrane mitochondriale par une translocase TOMM40 (Translocase of the Outer Mitochondria Homolog) où ils participent à différents processus comme la régulation calcique. Dans le cas d'une surproduction, l'APP perturbe l'activité de TOMM40, impliquée dans l'apport de protéines essentielles à la mitochondrie (Devi *et al.* 2006) et l'accumulation d'A β dans la mitochondrie diminuerait le flux calcique (Mattson *et al.* 2007). Les altérations subies par les mitochondries favorisent la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et de RNS (Reactive Nitrogen Species). Ces derniers augmentent le stress oxydatif provoquant une diminution du transport mitochondrial, contribuent à l'hyperphosphorylation de Tau (Reddy *et al.* 2011) et favorisent la production d'A β en augmentant l'activité de la β -sécrétase (Devi *et al.* 2012, Guglielmotto *et al.* 2009). En plus des atteintes neuronales, les mitochondries de la barrière hémato-encéphalique pourraient être touchées, conduisant à une fragilisation de cette dernière et à une diminution de la clairance des A β (Vargas *et al.* 2010). Les A β pourraient impacter directement la barrière hémato-encéphalique en perturbant le fonctionnement de la protéine LRP-1 (Lipoprotein-related peptide-1) responsable de la clairance des A β favorisant leur accumulation cérébrale (Owen *et al.* 2010).

4.D.1.d. Autres facteurs de risques environnementaux des formes sporadiques

Il existe un grand nombre d'autres facteurs potentiels de la maladie d'Alzheimer mais dont les réels impacts sont encore discutés. C'est notamment le cas de la dépression où une association est retrouvée avec la démence mais la non considération de facteurs comme la prise de traitements antidépresseurs ou encore le fait que la dépression puisse être une causalité de la démence minimisent les résultats de l'étude (Jorm *et al.* 2000).

Bien que soit observée une perte de poids chez 4 personnes sur 10 avant l'apparition des premiers symptômes de la maladie d'Alzheimer, les risques liés à l'alimentation ou aux polluants sont difficiles à étudier car très variés et difficiles à isoler. Aussi si l'obésité est un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer, il est difficile de déterminer si les régimes diététiques (comme le régime méditerranéen) protègent réellement contre la pathologie (Gu *et al.* 2010). La consommation de produits riches en antioxydants (le vin par exemple) contribuerait à réduire l'incidence de la maladie d'Alzheimer (Orgogozo *et al.* 1997). *In vitro*, la vitamine E pourrait limiter la formation de complexes A β -lipides peroxydés (Nagano *et al.* 2004). Récemment il a été observé *in vivo* dans un modèle de souris qu'une consommation régulière de caféine pourrait réduire le déclin cognitif en limitant l'hyperphosphorylation de Tau (Laurent *et al.* 2014). Enfin, certains polluants retrouvés notamment dans l'eau comme l'aluminium ou le plomb, pourraient faciliter l'agrégation des A β et ainsi augmenter le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Martyn *et al.* 1997, Wu *et al.* 2008).

4.D.2. Facteurs de risque génétiques de la maladie d'Alzheimer

4.D.2.a. Le gène de l'APOE

L'Apolipoprotéine E4 (APOE4) est le premier facteur de risque génétique de la maladie d'Alzheimer ayant été mis en évidence et représenterait 20% de la composante génétique des formes sporadiques (Corder *et al.* 1993, Farrer *et al.* 1997). Situé en position q13.2-13.3 sur le chromosome 19 humain, l'APOE possède trois allèles ϵ 2, ϵ 3 et ϵ 4, conduisant respectivement à la génération des trois isoformes APOE2, APOE3 et APOE4 (Mahley *et al.* 1988). L'APOE4, facteur de risque majeur porté par l'allèle ϵ 4, est retrouvé dans 10 à 15% dans la population générale (70 à 80% pour l' ϵ 3 et 5 à 10% pour l' ϵ 2). Etre porteur d'un seul allèle ϵ 4 augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer de 3 à 5 fois, et porter les deux allèles ϵ 4 (hétérozygote : APO ϵ 4/3 ou APO ϵ 4/2, homozygote : APO ϵ 4/4) augmente ce risque d'au moins un facteur 10. Aussi être porteur de l'allèle ϵ 4

diminue la moyenne d'âge de début d'apparition de la pathologie de 6 à 7 ans (Corder *et al.* 1993, Kuusisto *et al.* 1994, Kurz *et al.* 1996).

Au niveau du cerveau (deuxième organe à produire cette protéine derrière le foie, Elshourbagy *et al.* 1985), l'ApoE est le principal transporteur de lipides formant les lipoprotéines à hautes densité (HDL) à partir de phospholipides et de cholestérol (Huang *et al.* 2004, Mahley *et al.* 2006). Capable de capter divers lipides (cholestérol, acides gras et phospholipides) et lipoprotéines (HDL, LDL lipoprotéines à faible densité et VLDL lipoprotéines à très faible densité) l'ApoE régule et contrôle leur transport et leur redistribution dans le cerveau en servant de ligand aux récepteurs aux lipoprotéines situés à la surface cellulaire (comme le récepteur aux LDL) (Weisgraber *et al.* 1996, Huang *et al.* 2004). Ainsi l'ApoE pourrait rediriger les lipides vers les cellules ayant subi des dégâts membranaires chez le rat, aiderait à la synaptogenèse et à la maintenance des connexions synaptiques (Pfrieger *et al.* 2003). La capacité de l'APOE à moduler le métabolisme, le transport et la répartition du cholestérol lui donne un rôle crucial dans de nombreux métabolismes dépendants notamment des radeaux lipidiques comme le métabolisme de l'APP (Wahrle *et al.* 2002, Cordy *et al.* 2003).

Au niveau neuropathologique, Il a été montré qu'un taux élevé d'ApoE4 entraîne une altération mitochondriale conduisant à une augmentation du stress oxydatif et à une déstabilisation du métabolisme énergétique des neurones (Roses *et al.* 2006, Zhong *et al.* 2009). Contrairement à l'APOE4, l'expression d'APOE2 et d'APOE3 semble protectrice chez l'humain comme chez la souris (Corder *et al.* 1994, farrer *et al.* 1997, Buttini *et al.* 1999, Raber *et al.* 1998, Tiraboschi *et al.* 2004).

Chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer, Il a été montré que le niveau d'expression d'APOE est inversement corrélé à la quantité de dépôts amyloïdes observée (Lambert *et al.* 2005) et une diminution de la quantité de dépôts amyloïdes est constatée dans un modèle de souris KO (Knock-Out, où extinction d'un gène) pour le gène de l'APOE (Bales *et al.* 1997). De plus, les analyses histologiques de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer montrent que l'ApoE est présent au sein des plaques amyloïdes. Ces observations indiquent probablement une association directe entre l'ApoE et l'A β , de nombreux travaux ont pu montrer une liaison entre l'ApoE et l'A β directe en *in vitro* ou en *ex vivo*

(Strittmatter *et al.* 1993, LaDu *et al.* 1994). Cet ApoE semble intervenir sur plusieurs facettes du métabolisme de l'APP : production, clairance et accumulation.

Production

Un taux élevé en cholestérol central est associé avec l'allèle $\epsilon 4$ (Tao *et al.* 2014) et une forte concentration en cholestérol provoquerait une réorganisation de ces radeaux qui favoriserait une augmentation d'activité de la β -sécrétase et de la γ -sécrétase, responsable de la production des A β (Wahrle *et al.* 2002, Cordy *et al.* 2003) et diminue l'activité de l' α -sécrétase (Kojro *et al.* 2001). Ces modifications d'activité des sécrétases favoriseraient la voie amyloïdogène et donc la production d'A β .

Clairance

Si la clairance des peptides amyloïdes diminue au cours du vieillissement, L'ApoE4 aggraverait cette diminution (Tanzi *et al.* 2004). La réduction de la clairance des A β par l'ApoE4 pourrait se faire de manière directe et indirecte : les complexes formés par ApoE4-A β sont éliminés nettement moins rapidement que les complexes ApoE-A β , Apo2-A β ou ApoE3-A β à travers la barrière hémato-encéphalique (Castano *et al.* 1995, Bell *et al.* 2007, Deane *et al.* 2008) et l'ApoE réduirait aussi indirectement la clairance des A β en diminuant l'expression de l'Insulin Degrading Enzyme (IDE) capable de dégrader les A β (Farris *et al.* 2003, Jiang *et al.* 2008, Du *et al.* 2009).

Accumulation

En plus de réduire leur clairance, l'ApoE4 pourrait favoriser l'accumulation des peptides amyloïdes (A β) fibrillaires en se liant directement aux A β (Castano *et al.* 1995, Stratman *et al.* 2005, Reiman *et al.* 2009).

4.D.2.b. Les autres déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer

Si l'APOE4 représente à lui seul 20% du risque génétique de développer la maladie d'Alzheimer, 80% de cette composante génétique restait à déterminer. Cependant, la mise en évidence de nouveaux déterminants génétiques de cette pathologie a longtemps été freinée par des limites technologiques et méthodologiques (Lambert *et al.* 2007): le nombre restreint de participants au sein des études cas-témoins, la variabilité entre individus de différentes études et

l'hétérogénéité des échantillonnages. Dans un premier temps, les études d'association par approche gène-candidats ont identifié le gène du Sortilin Related receptor (SORL1), impliqué dans le trafic intracellulaire du Précurseur du Peptide Amyloïde (APP) (Rogaeva *et al.* 2007, Reitz *et al.* 2011).

L'apparition des puces à ADN, des études de grandes populations, d'une collaboration étroite et organisée entre les centres de données et de prélèvements et de la génomique à haut débit, ont permis l'analyse du génome de plusieurs dizaines de milliers d'individus et d'étudier simultanément et sans a priori des millions de polymorphismes (single nucleotide polymorphism ou SNP). Ainsi en 2009, les premières études d'association pangénomiques (GWA) à avoir mis en évidence de nouveaux gènes de susceptibilités pour la maladie d'Alzheimer (en plus de l'APOE4) sont les travaux d'Harold *et al.* pour CLU (Clusterine ou APOJ) et PICALM (Phosphatidylinositol-binding Clathrin Assembly Protein), ceux de Lambert *et al.* pour la CLU et CR1 (Complement component Receptor 1). D'autres gènes d'intérêts ont suivi après ces deux premières études : Bin1 (Bridging Integrator 1 ou Amphiphysine 2) (Seshadri *et al.* en 2010), ABCA7 (ATP Binding Cassette A7), EPHA1, CD2AP et MS4A6A/MS4A4E en 2011 dans les études de Hollingworth *et al.* et Naj *et al.*. Enfin, la récente méga méta-analyse réalisée par le consortium IGAP (International GenomicS of Alzheimer's Project) sur plus de 74000 sujets a permis de déterminer 12 nouveaux gènes de susceptibilité (en plus des 9 cités précédemment), incluant SORL1 (Lambert *et al.* 2013).

Certains de ces gènes pourraient influencer directement la production et la clairance des peptides amyloïdes comme c'est le cas de l'APOE ou de SORL1. La CLU, impliquée comme l'APOE dans le transport de lipides, serait capable de se complexer avec les A β favorisant ainsi leur clairance en participant à leur endocytose (DeMattos *et al.* 2004). Le CR1 fait partie de la voie du complément et est le récepteur du C3b et du C4b, favorisant l'internalisation des complexes immuns. CR1 pourrait favoriser la clairance des A β , ces derniers étant connus pour se complexer avec le C3b (Crehan *et al.* 2012). PICALM est connue pour recruter les clathrines sur les sites d'ancrage des vésicules intracellulaires et ainsi favoriser l'endocytose (Tebar *et al.* 1999). Il a récemment été montré que PICALM et Tau anormalement hyperphosphorylée colocalisent au niveau des dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer (Ando *et al.* 2013).

PICALM et Tau pourraient être clivées par les mêmes caspases (Ando *et al.* 2013). BIN1 a pour rôle de contrôler l'endocytose médiée par les clathrines, le bourgeonnement des vésicules d'endocytose et la dynamique du cytosquelette (Pant *et al.* 2009), contrôlant potentiellement ainsi une partie du métabolisme de l'APP. Récemment il a été montré que BIN1 pourrait interagir avec Tau (Chapuis *et al.* 2013), protéine de stabilisation des microtubules impliquée, lorsqu'elle est anormalement hyperphosphorylée, dans les dégénérescences neurofibrillaires composant la pathologie Alzheimer.

Tous ces résultats ont permis d'enrichir l'hypothèse de la cascade amyloïde et de montrer que cette hypothèse ne serait seulement valable pour les formes familiales de la maladie d'Alzheimer mais pourrait être aussi généralisables. L'étude approfondie des formes sporadiques a ainsi permis l'émergence de nouvelles hypothèses concernant la maladie d'Alzheimer mais aussi d'améliorer et de renforcer l'hypothèse de la cascade amyloïde (Fig.16). Ainsi il a été démontré que les plaques amyloïdes ne semblent pas être responsables des mécanismes pathologiques. Ce rôle serait tenu par l'accumulation préférentielle d'A β x-42, soit par surproduction soit par une diminution de leur clairance, et la formation d'oligomères d'A β x-42 très neurotoxiques (Hardy *et al.* 2002). Les plaques séniles seraient au final une résultante de la pathologie amyloïde. Par exemple, dans un modèle murin il a été montré que l'accélération de la fibrillogénèse des A β contribuait à améliorer les déficits fonctionnels observés chez ces souris en diminuant la concentration en oligomères (Cheng *et al.* 2007). Au final, ces observations et hypothèses mettent toutes en avant le rôle central du métabolisme de l'APP ainsi que l'équilibre entre production, clairance et dégradation du peptide amyloïde et de sa toxicité au niveau cellulaire.

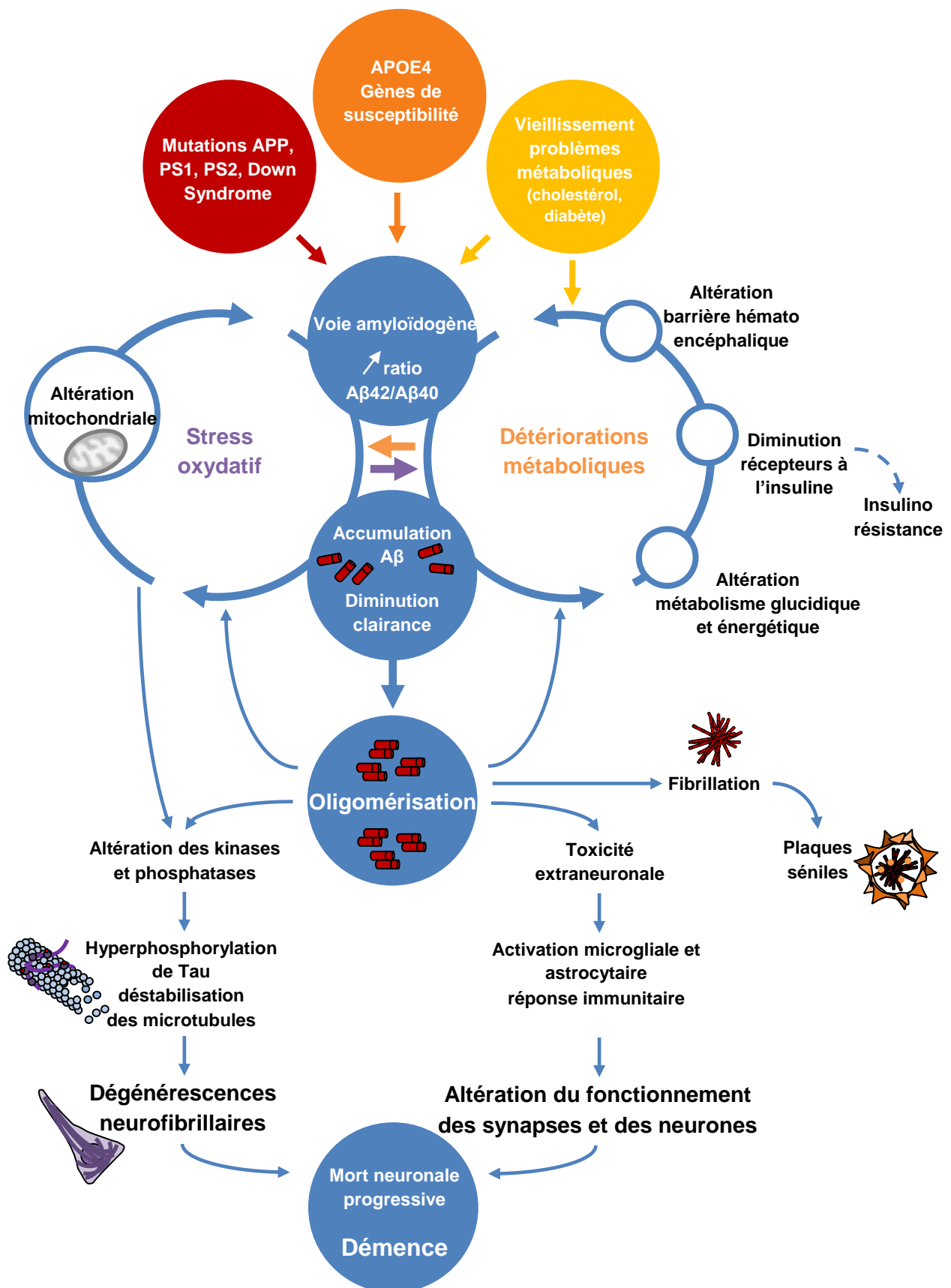


Figure 16. Schématisation de l'évolution de la cascade amyloïde. Ceci tient compte des nouvelles hypothèses : défaut de clairance des $A\beta$ et accumulation, stress oxydatif, détériorations métaboliques et métabolisme et Tau. Cette actualisation centralise l' $A\beta_{x-42}$, son accumulation/diminution et sa clairance progressive, exacerbés par le stress oxydatif et les problèmes métaboliques apparaissant au cours du vieillissement.

5. Homéostasie et régulation du métabolisme de l'APP

Si les formes familiales de la maladie d'Alzheimer touchent essentiellement et spécifiquement les gènes de l'APP et des présénilines expliquant l'augmentation de production et/ou de clivage de l'APP, il n'en va pas de même pour les formes sporadiques. En effet, ces formes pourraient être caractérisées par un déséquilibre de la balance du métabolisme de l'APP : production/dégradation, voie amyloïdogène/voie non-amyloïdogène et $A\beta_{x-40}/A\beta_{x-42}$. Il est donc capital de mieux cerner les événements qui modulent le métabolisme de l'APP comme par exemple le trafic vésiculaire ou les voies de dégradation.

5.1. Régulation du trafic membranaire de l'APP

La dynamique membranaire est impliquée directement dans la modulation du métabolisme de l'APP. En effet, La composition de la membrane plasmique en phospholipides versus cholestérol modifie les caractéristiques physico-chimiques de cette membrane ainsi que sa teneur en radeaux lipidiques. Ces radeaux sont des éléments clé de la plupart des métabolismes passant par la membrane plasmique : ils concentrent les protéines amenées à interagir entre elles et facilitent l'endocytose (en concentrant les clathrines par exemple). La β -sécrétase et la γ -sécrétase sont présentes dans ces radeaux lipidiques et une forte concentration en cholestérol réorganiserait ces radeaux conduisant à une augmentation d'activité de la β -sécrétase et de la γ -sécrétase (Wahrle *et al.* 2002, Cordy *et al.* 2003). A contrario, une faible concentration en cholestérol membranaire faciliterait l'activité α -sécrétase (Kojro *et al.* 2001, Querfurth *et al.* 2010). Des protéines membranaires sont connues pour stabiliser l'APP à la membrane plasmique, retardant son internalisation et favorisant ainsi l' α -sécrétase au détriment de la voie amyloïdogène. C'est notamment le cas de la Fe65 (Fiore *et al.* 1995).

5.2. Contrôle de la sécrétion et exosomes

L'APP membranaire est préférentiellement engagé dans la voie non-amyloïdogène et génère des fragments APPs- α qui sont directement libérés dans le milieu extracellulaire. La voie amyloïdogène est minoritaire et produit des $A\beta$ à

l'intérieur des endosomes et lysosomes. Or, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, cette voie est favorisée et conduit à une sécrétion de ces A β . La voie permettant de faire transiter les A β depuis les endosomes vers le milieu extracellulaire pourrait être en partie responsable de la pathologie amyloïde.

Il a été montré dans les GWAs que SORL1 est un des gènes de susceptibilité des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer ([Rogaeva et al. 2007](#), [Lambert et al. 2013](#)). D'ailleurs son expression est diminuée dans les cerveaux de patients atteints de cette maladie ([Scherzer et al. 2004](#)). Or chez la souris, une sur-expression de SORL1 entraîne une diminution de la quantité d'A β tandis que son extinction est liée au résultat inverse ([Andersen et al. 2005](#), [Offe et al. 2006](#)).

SORL1 (ou SORLA) est une protéine transmembranaire de 250kDa ([Yamazaki et al. 1996](#)) impliquée dans le contrôle du trafic intracellulaire de l'APP ([Herskowitz et al. 2012](#), [Fjorback et al. 2012](#)). Cette protéine intervient directement sur les acteurs du trafic antérograde et rétrograde de l'APP (comme AP1 ou GGA) entre le réseau Transgolgien et la voie endosome/lysosome. Ainsi, SORL1 pourrait séquestrer une partie de l'APP néo-généré dans le réseau transgolgien et/ou l'amener directement vers la voie de dégradation endosome/lysosome sans passer par la voie de sécrétion ([Schmidt et al. 2012](#), [Nielsen et al. 2007](#)). En le séquestrant dans le réseau transgolgien, SORL1 empêcherait la formation d'homodimères d'APP qui sont normalement les substrats préférentiels des sécrétases ([Schmidt et al. 2012](#)). De cette manière, SORL1 limiterait l'apport d'APP aux deux voies du métabolisme de l'APP. Enfin, SORL1 serait capable d'amener les A β néo-synthétisés directement vers la voie de dégradation lysosomale ([Caglayan et al. 2014](#)).

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, l'expression de SORL1 pourrait être diminuée, entraînant une diminution de séquestration de l'APP dans le réseau Transgolgien et une diminution de sa dégradation dans la voie lysosomale au profit de la voie amyloïdogène. De plus, il a été observé que cette diminution conduit à une accumulation d'A β dans des corps multi-vésiculaires qui peuvent fusionner avec la membrane plasmique et former des exosomes dans le milieu extracellulaire, participant ainsi à l'accumulation progressive des peptides amyloïdes ([Sharpley et al. 2008](#), [Rajendran et al. 2006](#)).

5.3. Voie endosome/lysosome et catabolisme intracellulaire de l'APP

Si le métabolisme de l'APP résulte d'une régulation entre son trafic vers les différents compartiments cellulaires et les différentes voies de dégradation potentielles, une partie de cette régulation est dépendante de séquences peptidiques sur l'APP, permettant son adressage aux différents compartiments cellulaires où il sera métabolisé, voire dégradé.

Ces séquences spécifiques sont localisées dans la partie C-terminale de l'APP (Lai *et al.* 1995 ; Kouchi *et al.* 1998 ; Kouchi *et al.* 1999) et semblent toutes impliquer le lysosome puisqu'aucune d'entre elles ne semble cibler le protéasome (Fig.17).

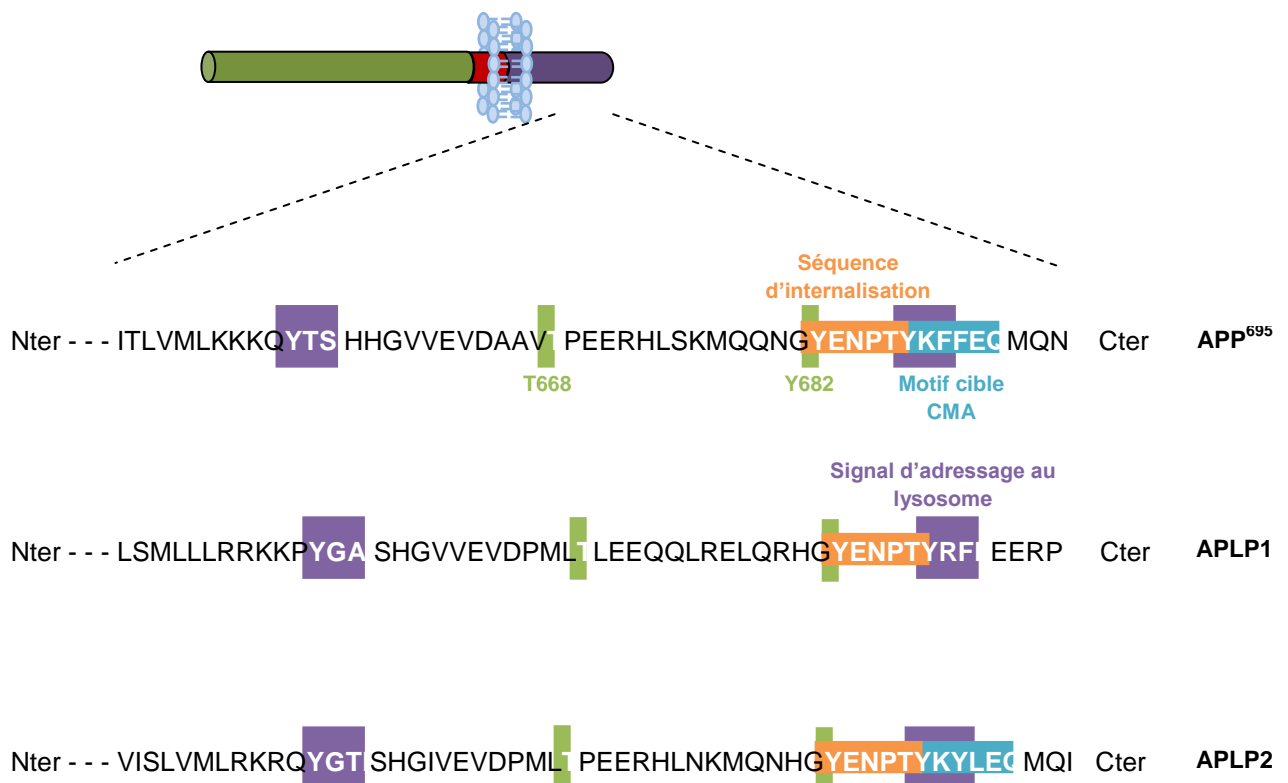


Figure 17. Motifs spécifiques présents dans la partie C-terminale de l'APP₆₉₅, de l'APLP1 et de l'APLP2. En orange, la séquence d'internalisation est impliquée dans l'internalisation de l'APP depuis la membrane. La séquence d'adressage au lysosome en violet permet de contrôler l'adressage de l'APP vers ce compartiment. Le motif du CMA (l'autophagie médiée par des protéines chaperonne) est ici potentiel. Enfin les deux sites de phosphorylation, la Thréonine 668 et la Tyrosine 682 sont en partie impliqués le contrôle du trafic intracellulaire de l'APP.

L'APP possède un motif particulier, -Y₆₈₂ENPTY₆₈₇- (ou -Y₆₈₂XPxY-), nécessaire à son endocytose lorsque cette protéine a atteint la membrane cellulaire (Fig.17) (Lai *et al.* 1995, Lee *et al.* 2008). Cette internalisation nécessite l'intervention des clathrines et de protéines adaptatrices qui vont stabiliser l'APP à la membrane comme Fe65, permettant à l'APP d'être acheminé vers la voie endosome/lysosome pour y être métabolisé par les enzymes clé de la voie amyloïdogène (Fiore *et al.* 1995).

Par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation, la thréonine 668 et la tyrosine 682 localisées au début de la séquence -YENPTY-, joueraient un rôle important dans la régulation de la dégradation de l'APP par cette voie d'endocytose (Fig.17) (Lai *et al.* 1995). En effet, la phosphorylation de ces sites entraînerait un changement de conformation de l'extrémité C-terminale de l'APP, l'empêchant d'interagir avec Fe65 (nécessaire pour son internalisation) ou d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal comme Grb2 (Suzuki et Nakaya, 2008, Tamayev *et al.* 2009).

Complémentairement au motif consensus -YENPTY-, la séquence -YxxØ- (-Y₆₈₇KFF₆₉₀- sur l'APP₆₉₅) (où Ø est un acide aminé très hydrophobe) pourrait permettre à l'APP d'être transloqué dans le lysosome (Fig.17) (Lai *et al.* 1995). Ce motif permettrait un accès direct de l'APP au lysosome depuis le réseau Transgolgien sans passer par la membrane (Brault et Bonifacino, 2009).

Le motif -KFERQ- est une séquence consensus permettant aux protéines cytosoliques d'être reconnues de façon spécifique par la voie d'autophagie régulée par des protéines chaperonnes (Chaperone-Mediated Autophagy - CMA) les amenant directement vers le lysosome pour leur dégradation (voir 3.E.4. Autophagie) (Fig.17) (Kouchi *et al.*, 1999). Cette séquence serait présente dans la partie C-terminale de l'APP sous forme -K₆₈₈FFEQ₆₉₂- et pourrait limiter l'accès de l'APP à la membrane en le dégradant précocement et réduirait ainsi son entrée dans les voies amyloïdes et non-amyloïdes.

Les protéases intervenant dans le catabolisme de l'APP au sein du lysosome sont des cathepsines. Les cathepsines sont essentielles pour l'élimination des protéines et ainsi évitent leur accumulation qui deviendrait pathologique. Au cours du vieillissement normal, il a été constaté que l'activité des cathepsines D, E et B était

augmentée dans le cerveau de rats (de 2 à 28mois) sauf pour la cathepsine L qui est diminuée (Nakanishi *et al.* 1994, 1997). Une perturbation progressive de la balance de dégradation lysosomale pourrait donc engendrer des neuropathies liées à l'âge. Le lysosome est un organite dont la particularité repose sur l'acidification importante de son milieu interne. L'acidification est réalisée grâce à de nombreuses pompes à protons localisées dans la membrane lysosomale (Weisz, 2003). Cet organite contient de nombreuses protéases dont l'activité enzymatique est optimale à pH acide (pH 3,5 à 5).

Bien que la membrane du lysosome soit imperméable et que la plupart des cathepsines soient inefficaces à pH neutre comme les cathepsines B, H et L, les cathepsines D, E et S semblent capables de fonctionner dans le cytoplasme et même en milieu extracellulaire (Bednarsky et Lynch, 1996, Turk *et al.* 2000). Ainsi, les cathepsines D, B et L actives ont été retrouvées au niveau des plaques séniles, marquant peut être une fragilisation membranaire du lysosome dans la maladie d'Alzheimer (Berstein *et al.* 1989 Nakamura *et al.* 1989, Cataldo *et al.* 1991). Une autre hypothèse basée sur les vésicules de sécrétions viendrait étayer ces observations : les cathepsines B et L sont retrouvées au niveau des vésicules de sécrétions et la cathepsine B est capable d'agir comme une β -sécrétase en clivant l'APP en A β dans ces vésicules (Hook *et al.* 2002, 2005). Une inhibition de la cathepsine B conduit à une diminution du niveau d'A β cérébral chez la souris (Hook *et al.* 2008). La cathepsine D est considérée comme la protéase majoritairement responsable de la clairance des A β au niveau intracellulaire chez l'Homme et le rat (McDermott et Gibson, 1996). Bien que des expériences menées sur des souris déficientes en cathepsine D excluent un rôle direct de cette cathepsine en tant que sécrétase (Saftig *et al.* 1996), il a été montré que, comme la cathepsine B, la cathepsine D peut cliver l'APP et générer des A β *in vitro*, suggérant son implication potentielle comme β -sécrétase (Sadik *et al.* 1999).

5.4. Voies de l'autophagie et du protéasome

Le protéasome est la voie de dégradation des protéines majoritaire dans la cellule. Les protéines cibles du protéasome doivent posséder une séquence spécifique leur permettant d'être ubiquitinyllées par l'ubiquitine ligase en partie N-

terminale et ainsi être dégradées (Lehman, 2009). Bien que des études aient montré que le protéasome interviendrait dans le processus physiopathologique de la MA, notamment en dégradant les protéines TAU, aucun motif consensus n'est présent sur l'APP.

Au-delà de ces mécanismes de dégradation spécifiques, il existe dans la cellule des mécanismes de dégradation généraux. L'autophagie est une voie importante de dégradation dans la cellule (Fig.18). Outre son rôle dans la mort cellulaire programmée, l'autophagie existe dans la cellule « normale » essentiellement pour son rôle dans la dégradation des surplus de protéines ou dans l'élimination d'organites endommagés (Klionsky *et al.* 2011). Il existe en tout trois formes d'autophagies : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes ou CMA (Fig.18).

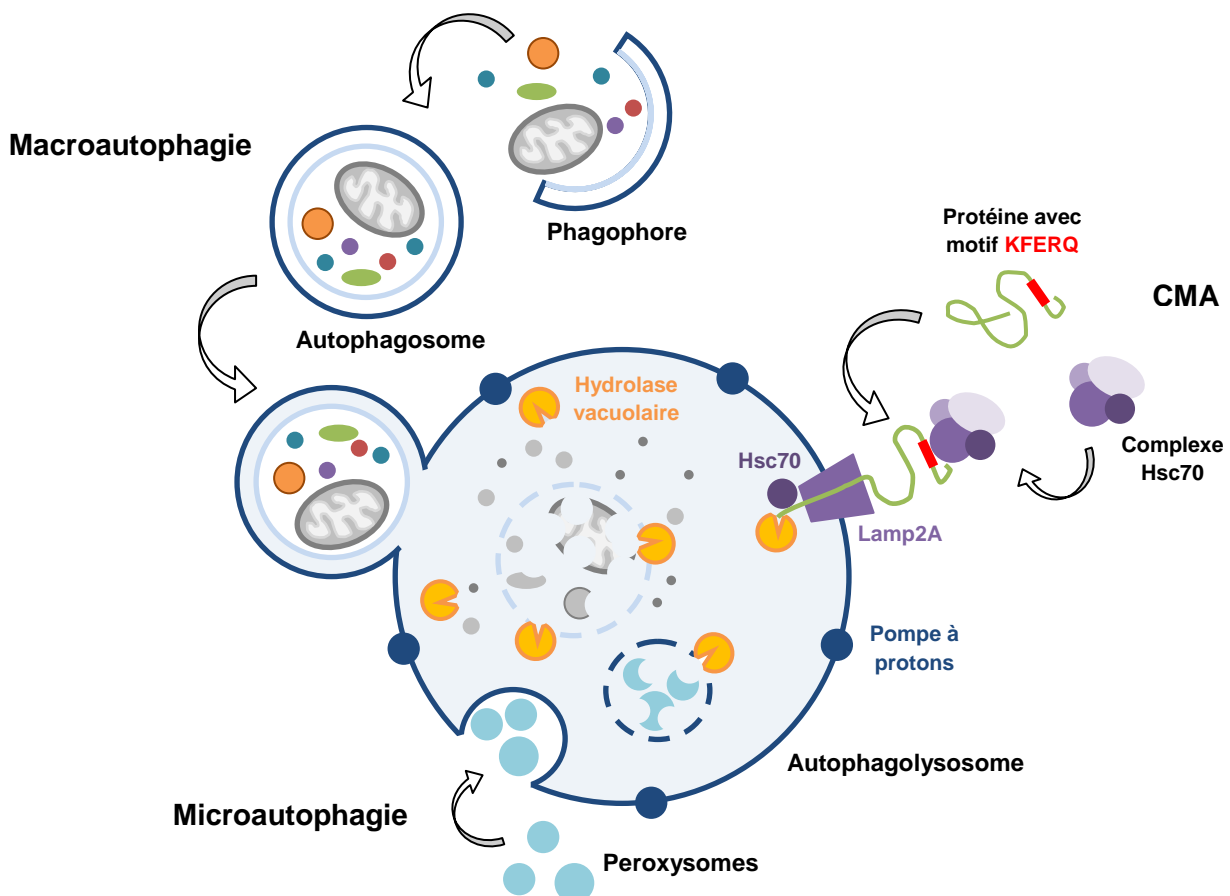


Figure 18. Représentation schématique des différentes voies d'autophagie dans la cellule. Seule la CMA est une voie spécifique de dégradation nécessitant un motif particulier présent dans la partie C-terminale des protéines cytosoliques. D'après Feng et al. 2014 et Wiraman et al. 2012

La macroautophagie est responsable de l'élimination des protéines qui ont échappé à leur dégradation par le protéasome, mais aussi de la dégradation d'organelles (Fig.18). Dans un premier temps, une double membrane provenant de différents compartiments cellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondrie, appareil de Golgi (Axe et al. 2008, Yen et al. 2010)) appelée phagophore s'allonge et vient séquestrer des protéines du cytoplasme et des organelles puis se referme pour former un autophagosome. Ce dernier fusionne avec le lysosome pour former une vésicule autophagique acide et relargue le corps autophagique dans le lumen qui est ensuite dégradé par des hydrolases vacuolaires (Suzuki et al. 2007). Le bourgeonnement et la formation de l'autophagosome sont régulés par un complexe de protéines membranaires nommées Atg (Autophagy-related protein). Il a été observé que le blocage de la formation des autophagosomes entraîne une accumulation de Tau et d'Aβ.

La microphagie est indépendante de l'autophagosome et débute par la formation de cargos de protéines devant être dégradés (Fig.18). Ces cargos sont alors invaginés dans la vacuole autophagique pour être directement dégradés par des hydrolases vacuolaires (Kunz et al. 2004). Peu ou pas d'informations sont disponibles quant à son implication dans la maladie d'Alzheimer.

Enfin, la CMA est, à ce jour, décrite comme la seule voie de dégradation autophagique spécifique du lysosome (Fig.18). La présence d'un motif -KFERQ- sur une protéine cible est nécessaire pour qu'elle soit reconnue par un complexe de protéines chaperonnes spécifique de la voie du CMA dont la protéine Hsc70 (Heat Shock 70), qui va acheminer la protéine au lysosome (Fig.18) (Massey et al. 2006). A son arrivée, le complexe est reconnu par Lamp2a, un récepteur de la membrane lysosomale qui permet la translocation de la protéine porteuse de la séquence -KFERQ- dans le lysosome afin qu'elle y soit dégradée (Fig.18) (Bandyopadhyay et al. 2010, Dice et al. 2007). Cette séquence consensus est présente sur les protéines Tau et α-synucléine qui sont dégradées par la CMA (Wang et al. 2009, Vogiatzi et al. 2008). Bien que cette voie d'autophagie concerne principalement les protéines cytosoliques (Massey et al. 2006), il existe aussi une séquence -K₆₈₈FFEQ₆₉₂- ressemblant au motif -KFERQ- sur l'APP, qui permettrait à cette dernière d'être reconnue et dégradée par la voie de la CMA (Kouchi et al., 1999).

5.5. Mitochondries et catabolisme intracellulaire de l'APP

Le métabolisme de l'APP peut être régulé par les fonctions mitochondriales de deux manières différentes. Premièrement, L'APP pourrait s'ancrer dans les membranes mitochondriales : elle formerait un complexe avec les translocases TOM (Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane) et TIM (Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane) et la partie transmembranaire de l'APP serait insérée dans la membrane externe mitochondriale laissant dépasser sa partie C-terminale en dehors de la mitochondrie ([Anandatheerthavarada et al. 2003](#), [Pavlov et al. 2011](#)). De là, l' α -sécrétase et la β -sécrétase pourraient cliver la partie externe de l'APP laissant un fragment N-terminal dans la membrane mitochondriale. Il a été montré que la γ -sécrétase est aussi localisée au niveau de la mitochondrie, permettant de cliver le fragment restant d'APP en peptide amyloïde dans la mitochondrie ([Pavlov et al. 2011](#)). L'autre possibilité est la translocation directe des A β à l'intérieur de la mitochondrie via le complexe TOM ([Pinho et al. 2014](#)). Des zones de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries appelées MAM (Mitochondria Associated endoplasmique reticulum Membranes) faciliteraient ces translocations directes ainsi que le clivage de proximité par la γ -sécrétase ([Area-Gomez et al. 2009](#)).

A l'intérieur de la matrice mitochondriale, les A β accumulés peuvent être dégradés par la métalloprotéase PreP (Presequence Protease) ([Mzhavia et al. 1999](#), [Falkevall et al. 2006](#)). Les clivages de l'A β par la PreP se situent dans la séquence C-terminale hydrophobique de l'A β empêchant ainsi son agrégation. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'activité de la PreP est diminuée spécifiquement dans les zones les plus touchées par les accumulations d'A β , comme le lobe temporal ([Pinho et al. 2014](#)). Cette réduction d'activité ne serait pas liée à une diminution de la quantité de PreP mais due à l'accumulation progressive de radicaux libres ou ROS ([Alikhani et al. 2011](#)), capables d'inhiber l'activité de PreP *in vitro* ([Teixeira et al. 2012](#)). Or l'accumulation progressive d'A β dans la mitochondrie conduit à une augmentation de la production de radicaux libres qui inhibent la protéine PreP et donc favorisent l'accumulation d'A β , cette amplification favorisant au final la production et la sécrétion d'A β ainsi que la dégénérescence synaptique ([Calkins et al. 2011](#), [Manczak et al. 2011](#)).

Ainsi, l'exploration de nouvelles voies de régulations et/ou de dégradation de l'APP est devenue une des meilleures approches pour mieux appréhender le processus physiopathologique de la MA.

6. Famille des ADAMs, implication dans la neuropathie Alzheimer

Le rôle crucial des ADAMs 10, 17 et 9 en tant qu' α -sécrétases autant dans la maladie d'Alzheimer que dans la physiologie normale, a permis de mettre en avant cette famille de métalloprotéases impliquées dans de nombreux processus biologiques. De nombreux travaux ont pu mettre en évidence que d'autres ADAMs pourraient intervenir dans le métabolisme de l'APP comme ADAM8 ou ADAM19 qui auraient une activité α -sécrétase (Naus *et al.* 2006, Tanabe *et al.* 2007). La structure des ADAMs étant très conservée au cours de l'évolution, il se pourrait que le rôle d'autre ADAMs dans le métabolisme ou le catabolisme de l'APP soit à déterminer.

6.A. Evolution des ADAMs

D'après la classification MEROPS (base de données en ligne pour les protéases et leurs inhibiteurs), les ADAMs appartiennent à la sous famille des protéases adamalysines M12B tout comme les ADAMTSs, les MMPs (Matrix Metalloproteases) et les SVMPs (Snake Venom metalloproteinases) ([http://merops.Sanger .ac.uk/](http://merops.Sanger.ac.uk/), Rawlings *et al.* 2014). Ces ADAMs ont été caractérisées initialement au niveau du venin de serpent et dans les protéines du sperme associées à la fertilité (Wolfsberg *et al.* 1995). A ce jour, il existe 38 ADAMs répertoriées dont 21 sont retrouvées chez l'humain (Fig.19) contre 37 chez la souris. On peut classer les ADAMs en deux catégories : 13 d'entre elles possèdent une activité protéase et les 8 autres n'en possèdent pas (Fig.19). L'activité protéase est caractérisée par la présence d'une séquence consensus très conservée chez les ADAMs, HEXGHXXGXXHD, localisée au niveau du domaine métalloprotéase (Bode *et al.* 1993). Les trois Histidines de cette séquence permettent la liaison d'un ion zinc (Zn^{2+}), capitale à l'activité catalytique de ces ADAMs d'où le terme

« métalloprotéase ». Cependant, les ADAMs ne possédant pas de séquence de liaison au zinc possèdent tout de même un domaine métalloprotéase qui leur permet de fixer d'autres protéines.

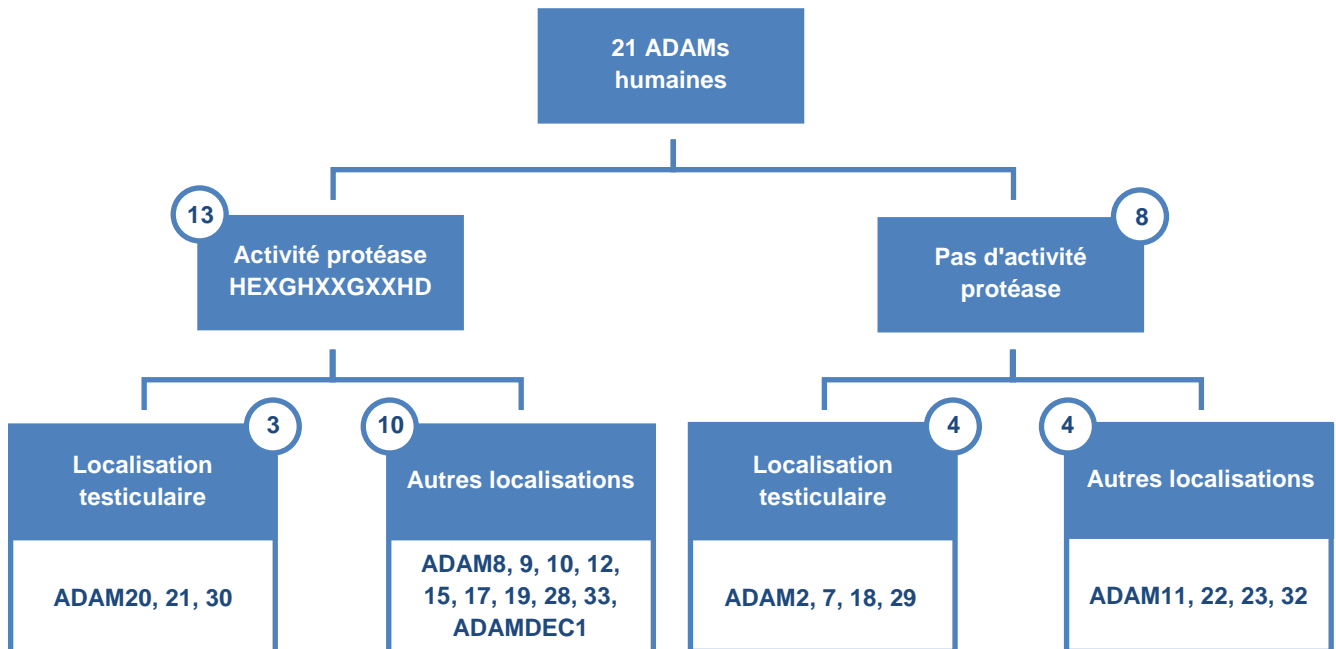


Figure 19. Hiérarchisation des 21 ADAMs humaines. Les deux tiers des ADAMs possèdent une activité protéase et un tiers présente une localisation testiculaire. La séquence HEXGHXXGXXHD est un motif hautement conservé chez les ADAMs possédant un domaine catalytique actif et leur permettent de recruter un ion métallique nécessaire à leur activité. *D'après Edwards et al. 2008*

Un autre classement peut être effectué en fonction de l'évolution structurale et de la phylogénie des ADAMs. Le génome d'un chordé primitif, *Ciona intestinalis*, contient 4 gènes d'ADAMs précurseurs : ADAMa et ADAMb, précurseurs des ADAM17 et 10, et les ADAMc1 et c2, précurseurs des ADAM2, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 18, 19, 22, 23, 28, 32 et 33. Les autres ADAMs comme ADAM30 sont apparues plus tard au cours de l'évolution chez les vertébrés (Huxley-Jones et al. 2007). Et c'est notamment grâce à la structure caractéristique très conservée que de nouvelles ADAMs ont été découvertes.

6.B. Structure des ADAMs

En plus du peptide signal leur permettant de s'engager dans la voie de sécrétion pour maturer, toutes les métalloprotéases partagent la même caractéristique : elles possèdent toutes un domaine métalloprotéase couplé à un prodomaine (Fig.20).

Le prodomaine agit comme une chaperonne endoprotéique qui empêche l'activation du site catalytique, participe à la bonne conformation de la protéase et prévient le site des dégradations qui pourraient survenir lors de la maturation de la protéase dans la voie de sécrétion (Fig.20) (Roghani *et al.* 1999, Milla *et al.* 2006). Le prodomaine est clivé lors du transit de la protéase dans le réseau transgolgien par des pro-protéines convertases comme par exemple les furines (Lum *et al.* 1998, Endres *et al.* 2003). Certaines ADAMs pourraient se séparer de leur prodomaine par autocatalyse comme ADAM8 et ADAM28 (Howard *et al.* 2000, Schlomann *et al.* 2002). Le prodomaine clivé et isolé pourrait intervenir en tant qu'inhibiteur des ADAMs comme c'est le cas pour ADAM10 et 17 (Gonzales *et al.* 2004). Enfin, pour certaines ADAMs comme ADAM12, le prodomaine clivé pourrait rester attaché au domaine métalloprotéase sans gêner le site catalytique (Wewer *et al.* 2006).

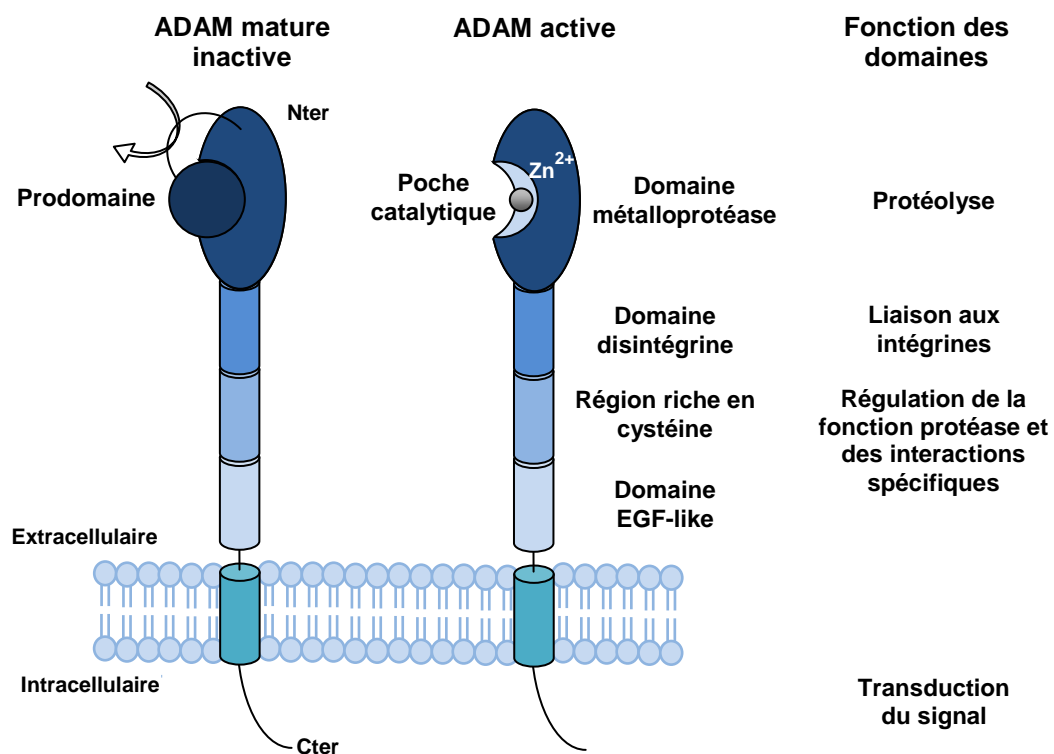


Figure 20. Représentation schématique des différents domaines d'une ADAM. Les fonctions connues pour chaque domaine sont précisées. Le prodomaine peut être clivé et libéré comme chez la plupart des ADAMs ou rester lié au domaine catalytique sans l'obstruer comme chez ADAM12 par exemple. Les ADAMs possédant un domaine catalytique actif présentent une liaison avec un ion métallique (cuivre ou zinc) comme représenté ici en gris. D'après Duffy *et al.* 2009

Lié directement à la partie C-terminale du prodomaine, le domaine métalloprotéase est composé de trois parties distinctes : deux parties globulaires entourant le site catalytique (Fig.20) (Gomis-Ruth, 2003). Ce site catalytique contient la séquence consensus HEXGHXXGXXHD qui permet l'interaction avec l'ion Zinc. Cette interaction a lieu au fond de la poche catalytique. Bien que cette séquence consensus soit très conservée et impérative, ADAM17 et ADAM33 ne partagent que 26% d'homologie pour leur domaine catalytique (Orth *et al.* 2004).

A partir du domaine métalloprotéase, la structure des métalloprotéases diverge fortement en fonction des familles. Le domaine disintégrine et le domaine riche en cystéine sont communs aux ADAMs, aux ADAMTSs et aux SVMPS, par contre seules les ADAMs possèdent une queue cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine EGF-like, sauf pour ADAM10 et 17 (Janes *et al.* 2005).

Suivant le domaine métalloprotéase, le domaine disintégrine est impliqué dans l'interaction des ADAMs avec les intégrines (Fig.21). Cette interaction est assurée par la boucle disintégrine, une séquence de 14 acides aminés de ce domaine : CRXXXXXCDXXEXC (White *et al.* 2003). Bien que la fonction principale des ADAMs soit la catalyse d'autres protéines via leur domaine métalloprotéase, ce domaine disintégrine accorde une autre fonction aux ADAMs : modulation de l'adhésion cellulaire via les intégrines (Arribas *et al.* 2006). La structure particulière de ce domaine disintégrine confère à ces ADAMs une forme coudée en C caractéristique (Takeda *et al.* 2006).

Un autre domaine participe à cette structuration en C des ADAMs : le domaine riche en cystéines (Fig.21) (Takeda *et al.* 2006). Ce domaine peut interagir avec d'autres protéines pour contrôler et moduler les fonctions des ADAMs. ADAM13 montrent une liaison de son domaine riche en cystéine avec la Fibronectine (Gaultier *et al.* 2002) alors qu'ADAM10 se lie à l'Ephrine, protéines extracellulaire impliquée dans la répulsion cellulaire et la guidance axonale (Janes *et al.* 2005).

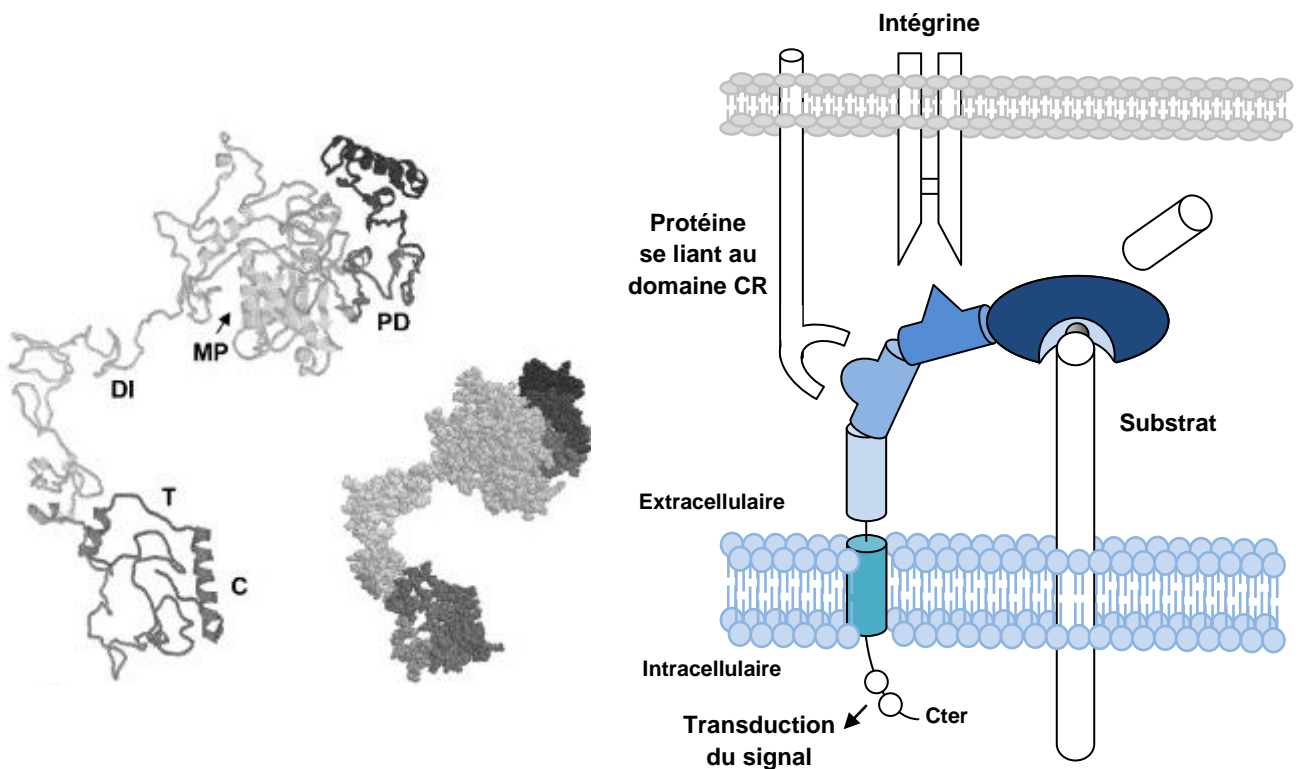


Figure 21. Représentation de la structure en « C » des ADAMs. Cette forme caractéristique est donnée par les domaines disintégrine et riches en cystéines. La poche catalytique est alors orientée vers la membrane tandis que les domaines du coude s'exposent aux protéines pouvant se lier aux ADAMs. Une partie des ADAMs possède un domaine catalytique actif (ici en bleu foncé leur permettant de cliver leurs substrats et les impliquent dans de nombreux processus cellulaires et métaboliques. *D'après Yang et al. 2006*

Très peu d'informations sont connues sur le rôle du domaine EGF-like (Fig.21). Bien qu'il soit absent chez ADAM10 et 17, Il est spécifique aux ADAMs (Janes *et al.* 2005). Ce domaine pourrait servir d'intercalaire entre le domaine riche en cystéines et le domaine transmembranaire (Takeda, 2009).

Le domaine transmembranaire, outre son rôle d'ancrage de la protéase à la membrane, pourrait indirectement participer à la régulation des ADAMs (Fig.21). En effet, il a été montré que l'activité de certaines ADAMs comme ADAM17 et 19 varient en fonction de la concentration en cholestérol membranaire. Une augmentation de cholestérol favorise la création de radeaux lipidiques qui séquestrent ces ADAMs (Tellier *et al.* 2006). Aussi, une faible concentration en cholestérol membranaire faciliterait l'activité α -sécrétase et donc d'ADAM17 (Kojro *et al.* 2001, Querfurth *et al.* 2010).

Enfin, le domaine C-terminal ou queue cytoplasmique participerait essentiellement à la transduction du signal et au trafic intracellulaire (Fig.21). Ce domaine peut contenir des motifs spécifiques riches en prolines PXXP qui sont des sites de fixation pour les protéines possédant un domaine SH3. Il est présent sur les ADAM7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 22, 29 et 33 (Seals et Courtneidge, 2003). Ces ADAMs peuvent contenir de un à 13 domaines riches en prolines comme ADAM15. Il a été montré, par exemple, que les queues cytoplasmiques d'ADAM 10 et 17 sont capables d'interagir avec la protéine SAP97 (Synapse Associated Protein 97) impliquée dans leur bonne localisation à la membrane synaptique et à l'augmentation de leur activité α -sécrétase (Peiretti *et al.* 2003, Marcello *et al.* 2007). Des résidus Sérines, Thréonines et Tyrosines sont aussi présents dans cette queue cytoplasmique. Ces sites peuvent être phosphorylés par des kinases et ainsi moduler l'activité des ADAMs. Par exemple, la phosphorylation de la Thréonine 735 d'ADAM17 par Erk et la voie des MAP kinases régule son trafic entre le réticulum endoplasmique et la membrane cellulaire (Diaz-Rodriguez *et al.* 2002, Soond *et al.* 2005).

6.C. Fonctions physiologiques et Implications pathologiques des ADAMs

6.C.1. Fonctions physiologiques des ADAMs dans le système nerveux adulte

La première fonction biologique des ADAMs est la catalyse de ses substrats. De nombreuses protéines membranaires nécessitent le clivage protéolytique de leur prodomaine pour être actives. C'est notamment le cas de cytokines comme le proTNF α clivé en TNF α par ADAM17 (Black *et al.* 1997). Certaines ADAMs comme ADAM8 et ADAM28 sont capables de s'autocatalyser pour se séparer de leur prodomaine (Howard *et al.* 2000, Schlomann *et al.* 2002). En plus d'activer des protéines, le clivage protéolytique des ADAMs permettrait le relargage extracellulaire de peptides impliqués dans la transduction du signal, comme des facteurs de croissance dont le pro-EGF (Epidermal Growth Factor) clivé en EGF par ADAM10 (Sahin *et al.* 2004). D'une certaine manière, ce clivage régulerait la communication autocrine, juxtacrine ou paracrine entre cellules. A l'inverse, le clivage protéolytique pourrait aussi stopper l'action de certains ligands. Le récepteur membranaire RAGE

(Receptor for Advanced Glycation Endproducts) est clivé par ADAM10, permettant ainsi la libération du site récepteur dans le milieu extracellulaire. Ce récepteur libre peut alors séquestrer ses ligands et ainsi diminuer leur disponibilité pour les récepteurs de surface, limitant ou stoppant ainsi la transmission du signal (Raucci *et al.* 2008).

Enfin, ces ADAMs participent à la protéolyse régulée intramembranaire ou protéolyse séquentielle intramembranaire (Saftig *et Hatmann*, 2005, Tousseyn *et al.* 2006). Contrairement aux cas précédents, le clivage de la protéine transmembranaire cible ne conduit pas directement à une activation ou une transduction de signal. Après clivage par une ADAMs, la protéine transmembranaire est une nouvelle fois clivée par une autre protéase. C'est notamment le cas de l'APP qui est clivé dans un premier temps par ADAMs 17, 10 ou 9 les α -sécrétases formant ainsi de l'APPs- α qui est sécrété hors de la cellule. Le deuxième fragment, le CTF- α , est toujours ancré dans la membrane plasmique et est alors clivé à son tour par la γ -sécrétase libérant ainsi l'AICD en intracellulaire qui est un facteur de transcription (Selkoe *et al.* 2001, LaFerla *et al.* 2005). D'autres protéines transmembranaires sont concernées par la protéolyse séquentielle intramembranaire comme les APLP1 et 2 et Notch (impliquée dans le développement, la différenciation cellulaire et l'angiogenèse).

Par ces différents mécanismes, les ADAMs sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques du système nerveux. En clivant l'APP, les ADAMs 10 et 17 (et par extension les ADAM8 et 9) interviennent indirectement dans l'excitabilité cellulaire et la plasticité synaptique (Turner *et al.* 2003). Ceci a pu être déterminé grâce à l'observation de souris APP-/- présentant des problèmes importants dans les exercices faisant appel à la mémoire des tâches et donc à la plasticité synaptique (Dawson *et al.* 1999). Via leurs interactions avec les intégrines, les ADAM9, 15, 23 et 33 agiraient sur le fonctionnement des synapses et sur leur plasticité en consolidant la potentialisation à long terme postsynaptique par exemple (Clegg *et al.* 2003, Chun *et al.* 2001). Présent dans les neurones adultes, ADAM8 favoriserait la survie neuronale *in vitro* en clivant la protéine CHL1 (Close Homologue of the Neuronal Cell Adhesion molecule L1) ce qui libérerait un fragment extracellulaire qui agirait comme un inhibiteur de la mort neuronale (Naus *et al.* 2004).

Au niveau du gyrus denté de l'hippocampe et dans la région sous-ventriculaire des ventricules latéraux se poursuit la neurogenèse chez l'adulte. Cette neurogenèse fait intervenir un groupe de protéines qui sont toutes des substrats des ADAMs : l'APP, Notch, le TGF α et l'EGF. Dans un cas, les ADAMs (ADAM 10 et 17) clivent l'APP et Notch produisant ainsi des fragments intracellulaires qui vont réguler les fonctions synaptiques comme l'AICD en tant que facteur de transcription ([Selkoe et al. 2001](#), [LaFerla et al. 2005](#)). Dans l'autre cas, le clivage du prodomaine de la pro-EGF par ADAM10 et du pro-TGF α par ADAM17 conduit à la libération de l'EGF et à l'activation du TGF α respectivement. Ces ADAMs agissent donc indirectement sur la neurogenèse mais pourraient aussi participer aux réparations axonales chez l'adulte. En effet, il a été montré que des lésions provoquées par l'injection d'acide kainique dans le gyrus denté de rats conduit à une augmentation de l'expression d'ADAM9 et 10 ([Cavazos et al. 2003](#)).

Finalement, les ADAMs interviendraient aussi dans l'angiogenèse puisque les souris ADAM15^{-/-} présentent une angiogenèse nettement diminuée. ADAM15 est présent au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales vasculaires cérébrales ([Ham et al. 2002](#)). Il a été montré que sous l'induction par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ADAM10 et 17 sont responsables des clivages activateurs du VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) et de la VE-Cadhérine ([Donners et al. 2010](#), [Swendeman et al. 2008](#)) protéines impliquées dans la perméabilité vasculaire permettant la migration des cellules endothéliales nécessaire à l'angiogenèse.

6.C.2. Implication des ADAMs dans le développement cérébral

De nombreuses ADAMs interviennent au cours du développement cérébral à différents niveaux : prolifération neuronale, migration, différenciation, croissance axonale et dendritique et enfin synaptogenèse. Ces rôles ont été mis à jour essentiellement grâce à la création de modèles de souris KO pour les ADAMs.

Prolifération Neuronale

Les souris ADAM10^{-/-} présentent un taux de survie très faible jusqu'à un maximum de 9,5 jours et présentent un fort déficit en développement neuronal (Hartmann *et al.* 2002) témoignant d'une implication d'ADAM10 dans la prolifération des primo-neurones. Une expression d'ADAM10 est encore retrouvée au niveau de la formation hippocampique chez la souris au 17^e jour post natal (E17) (Marcinkiewicz et Seidah, 2000). ADAM10 pourrait stimuler la prolifération neuronale via l'EGF.

Migration neuronale

Grâce à leur capacité d'interaction avec les intégrines, protéines impliquées dans la migration des primo-neurones (Tate *et al.* 2004), les ADAMs interviennent dans la migration neuronale au cours du développement cérébral. Cette fonction est essentiellement portée par ADAM13 (mais aussi potentiellement par ADAM21 (Yang *et al.* 2005)). ADAM13 se fixe à la Fibronectine et à la sous unité $\beta 1$ de l'intégrine via son domaine disintégrine pendant que son domaine métalloprotéase clive la Fibronectine (Alfarandi *et al.* 2001, Gaultier *et al.* 2002). ADAM13 pourrait donc moduler la migration neuronale en interagissant avec ces intégrines.

Différenciation et survie neuronale

La différenciation et la survie/mort neuronale sont deux aspects importants du développement cérébral. Les neurégulines sont impliquées directement dans la plupart des processus de différenciation neuronaux (Anton *et al.* 2004). Ces neurégulines nécessitent le clivage de leur prodomaine pour être actives. Chez la Xénope au 13,5^e jour post natal (E13,5), ADAM19 pourrait cliver et activer ces neurégulines durant la neurogenèse des neurones olfactifs (Beites *et al.* 2005). In vitro, par catalyse du prodomaine de la protéine CHL1, ADAM8 favoriserait la survie neuronale (Naus *et al.* 2004).

Croissance axonale et dendritique

L'activité protéolytique des ADAMs mais aussi des MMPs a été retrouvée au niveau de l'extrémité apicale des axones en élongation (Yang *et al.* 2006). L'utilisation d'un inhibiteur des métalloprotéases matricielles et ADAMs entraîne des erreurs dans le prolongement et la guidance axonale des neurones (Webber *et al.* 2002), confirmant ainsi l'implication des ADAMs et MMPs dans la prolifération

axonale. En fonction des modèles animaux étudiés, différentes populations d'ADAMs (ADAM10, 14, 19, 21 et 23) et de MMPs (MMP2, 3 et 9) semblent impliquées. Chez la Drosophile, ADAM10 interviendrait dans l'extension des axones moteurs (Fambrough *et al.* 1996). Ce rôle serait tenu essentiellement par ADAM23 et 19 chez les mammifères (Leighton *et al.* 2001, Wakatsuki *et al.* 2004). En plus de leur implication dans la croissance axonale, les ADAMs pourraient agir sur la prolifération dendritique et la synaptogenèse indirectement. En effet, les ADAM10 et 17 peuvent cliver l'APP, Notch et le prodomaine des neurégulines. Or ces protéines sont directement impliquées dans la synaptogenèse et la dendritogenèse (Morimoto *et al.* 1998, Salama-Cohen *et al.* 2005, Loeb *et al.* 2003). Les ADAMs potentiellement impliquées seraient les ADAMs 10, 11, 15, 17 et 23.

Myélinisation axonale

Finalement, il a été observé que les souris ADAM22^{-/-} souffraient d'une forte hypomyélinisation des nerfs périphériques suggérant l'implication cruciale d'ADAM22 dans les processus de myélinisation des axones périphériques (Sagane *et al.* 2005). D'autres ADAMs, interviendraient dans la régulation de la myélinisation mais de manière plus indirecte en agissant sur les intégrines comme ADAM15 (Milner *et al.* 1997), ou en modulant les neurégulines par clivage de leur prodomaine comme ADAM19 (Wakatsuki *et al.* 2004).

6.C.3. Autre rôle majeur des ADAMs : la fertilité

Une grande partie des ADAMs sont exprimées presque exclusivement dans les testicules jouant un rôle important dans la spermatogenèse : ADAM1, 2, 7, 18, 20, 21, 29 et 30 (Puente et Lopez-Otin, 2004). Les deux premières ADAMs à avoir été identifiées chez les mammifères sont ADAM 1 et 2, aussi appelées Fertiline- α et β (Blobel *et al.* 1992). Ces deux ADAMs s'hétérodimérisent et forment le complexe protéique spermatique, la fertiline, dont le rôle est primordial pour la fixation puis la fusion du sperme avec l'ovule (Primakoff et Myles, 2000). Les ADAMs exprimées dans la lignée spermatogénique et le sperme pourraient agir en synergie. En effet l'absence d'ADAM2 et 3 chez des souris KO pour ces deux ADAMs suffit à diminuer la quantité d'ADAM5 et 7 à la surface du sperme (Kim *et al.* 2006).

ADAMs	Autres noms	Localisation	KO souris	Pathologies associées
2	Fertiline β	Testicules	Mâle stérile	-
7	EAP1	Testicules, érythrocytes	-	-
8	CD156, MS2	Moelle osseuse, cellules hématopoïétiques, cellules lymphoïdes	Aucun effet	Cancer pancréas, gliomes, arthrite rhumatoïde
9	Meltrine γ , MDC9	Cellules souches, tissu adipeux, pancréas, placenta	Aucun effet	Cancer du sein, du colon, intestin, prostate
10	Kuzbanian, MADM	Cellules souches mésenchymateuses, placenta, sang, cellules myéloïdes, vessie, moelle osseuse	Létal au stade embryonnaire, malformation du système nerveux central et cardiaque	Inflammation, cancer de la prostate, allergies, maladie d'Alzheimer
11	MDC	Erythrocytes, système nerveux central et périphérique, foie, système biliaire, glandes salivaires	Défaut dans l'apprentissage spatial lié à l'hippocampe, réponse nociceptive altérée	-
12	Meltrine α	Placenta, cellules souches mésenchymateuses, cellules souches adultes	30% de létalité embryonnaire, anomalie du tissu adipeux brun	Cancer du sein, de la vessie
15	Metargidine, MDC15	ubiquitaire	Diminution de la néovascularisation tumorale, Osteoarthritis tardive	Cancer de la prostate, du poumon, du sein
17	TACE	ubiquitaire	Létalité périnatale, hypoplasie pulmonaire, défaut de maturation des tissus épithéliaux	Cancer du sein, arthrite rhumatoïde, scléroses multiples, Diabètes
18	tMDC III	Testicules, érythrocytes, moelle osseuse pancréas	-	-
19	Meltrine β	ubiquitaire	80% de létalité post-natale, nombreuses atteintes cardiovasculaires	gliomes
20	-	Testicules, érythrocytes, moelle osseuse	-	-
21	ADAM31	Testicules, érythrocytes, système nerveux central et périphérique	-	-
22	MDC2	système nerveux central et périphérique	Létalité post-natale, ataxie, hypomyélinisation des nerfs périphériques	Diminué dans les gliomes
23	MDC3	système nerveux central et périphérique, cœur	-	-
28	eMDC II, MDC-Lm, MDC-Ls	cellules hématopoïétiques, pancréas, système gastrointestinal, moelle osseuse, système lymphatique, système respiratoire, vessie	-	-
29	Svph1	Testicules	-	Cancer colorectal
30	Svph4	Testicules	-	-
32	-	Cellules lymphoïdes du sang	-	-
33	-	Utérus, système urogénital, système respiratoire, système gastrointestinal, langue, système endocrine	Aucun effet	Asthme, psoriasis

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différentes localisations des ADAMs, l'effet de leur KO dans des modèles murins ainsi que les pathologies connues associées à ces ADAMs. D'après Yang et al. 2006 et Edwards et al. 2008

6.C.4. ADAMs et pathologies

Du fait de leur phylogénie, les ADAMs remplissent de nombreux rôles physiologiques essentiels dans de nombreux types cellulaires. Ces protéases sont souvent au carrefour de métabolismes et de transduction de signaux variés expliquant ainsi leur implication dans certaines pathologies graves (Tab.1). On retrouve ainsi de nombreuses ADAMs surexprimées dans les cancers : pancréatique pour ADAM8, prostatique pour ADAM9 ou encore pulmonaire pour ADAM17... Leur implication dans ces maladies passerait essentiellement par leur activité catalytique sur le TNF α , l'E-cadhérine (protéine cruciale pour l'adhésion cellule-cellule) et les facteurs de croissance comme l'EGF, protéines impliquées directement dans la carcinogenèse et la progression cancéreuse. Outre les cancers, les ADAM10 et 17 principalement, mais aussi ADAM8 et 9, sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer de part leur action sur le métabolisme de l'APP. Il est cependant intéressant de noter que, même si un nombre conséquent d'ADAMs sont impliquées dans des pathologies, il n'existe qu'une seule mutation fonctionnelle d'ADAM chez l'humain. Cette mutation cible ADAM33 et est un facteur de risque pour l'asthme (Tab.1) (Cakebread *et al.* 2004). Il est possible que cette mutation ait un impact neurologique aussi puisque qu'ADAM33 est présente au niveau des neurones de l'hippocampe et du cervelet (Yoshinaka *et al.* 2002). Néanmoins, aucune neuropathie n'a pour l'instant été retrouvée associée avec ce facteur de risque. Des récents travaux sur les facteurs de risque génétiques des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer ont pu mettre en évidence deux SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) dans le gène d'ADAM12 significativement associés à la pathologie (Harold *et al.* 2007).

6.D. Un nouvel acteur du métabolisme de l'APP : ADAM30

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative complexe. Si les formes familiales ont permis d'identifier les mécanismes mises en jeu dans cette maladie, la plupart des formes de maladie d'Alzheimer répertoriées sont sporadiques et le processus physiopathologique est moins bien cerné. Ces formes sporadiques sont caractérisées par un déséquilibre de la balance du métabolisme de l'APP : production/dégradation, voie amyloïdogène/voie non-amyloïdogène et A β_{x-40} /A β_{x-42} . Mieux comprendre les mécanismes intervenant dans ces voies de production, trafic

vésiculaire ou dégradation est capital pour déterminer la source de la pathologie et la chronologie des événements en découlant.

Les métalloprotéases et plus particulièrement les ADAMs, ont un rôle central dans le métabolisme de l'APP grâce à leur activité α -sécrétase. Si ADAM10 et ADAM17 ont été confirmées pour tenantes du rôle d' α -sécrétase, ADAM9 et ADAM8 seraient impliquées indirectement ou réguleraient de cette sécrétase. De plus, deux SNPs seraient présents dans le gène d'ADAM12 et associés à la maladie d'Alzheimer, son rôle dans le processus physiopathologique restant à déterminer. Il se pourrait donc que d'autres ADAMs, voire d'autres métalloprotéases, soient impliquées dans le métabolisme de l'APP.

Partant de ce constat, le laboratoire a émis l'hypothèse que la comparaison de l'expression des différentes métalloprotéases existantes, comprenant les ADAMs mais aussi les MMPs et autres protéines de la même famille, dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer versus cerveaux de témoins permettrait de mettre en évidence une implication dans le métabolisme de l'APP d'une ou plusieurs nouvelles métalloprotéases. Ainsi, par une analyse transcriptomique systématique des 132 gènes codant pour toutes les ADAMs, MMPs et autres protéines associées, réalisée à partir d'ARNs totaux extraits du cortex frontal de 12 patients atteints de la maladie contre 12 contrôles sains, 4 ADAMs ont été identifiées comme étant différentiellement exprimées. ADAM17, ADAM33 et ADAMTS16 sont retrouvées significativement sur-exprimées dans le cerveau des patients comparés aux contrôles, sauf ADAM30 qui est significativement sous-exprimée. Pour vérifier ces premiers résultats, les mêmes analyses ont été effectuées dans une nouvelle population plus grande contenant 51 patients atteints de la maladie et 42 contrôles. Seule la sous-expression d'ADAM30 (Fig.22.A) et la sur-expression d'ADAM33 ont pu être validées.

L'étape suivante fut de vérifier si ces ADAMs différentiellement exprimées sont aussi capable de moduler directement le métabolisme de l'APP. La sur-expression d'ADAM33 dans des lignées cellulaires issues de neuroblastomes (SKNSH-SY5Y) et des lignées de cellules embryonnaires de rein (HEK293) sur-exprimant de façon stable l'APP^{695wt} humain, ne modifie pas la production des différents métabolites issus du clivage de l'APP (APPs- α , APPs- β , A β _{x-40} et A β _{x-42}). ADAM33 pourrait donc

être impliqué dans la maladie d'Alzheimer mais pas dans la régulation du métabolisme de l'APP.

En revanche, ADAM30 présente une diminution de son expression de près de 50% dans le tissu cérébral des malades comparé à celui des témoins (Fig.22.A). De plus, la quantité augmentée de dépôts de peptides $A\beta_{1-42}$ mesurée dans le parenchyme des patients est proportionnellement corrélée à la diminution de l'expression d'ADAM30 dans leur cerveau (Fig.22.B). Cette dernière observation est venue renforcer l'hypothèse du rôle neuronal d'ADAM30 dans le métabolisme de l'APP.

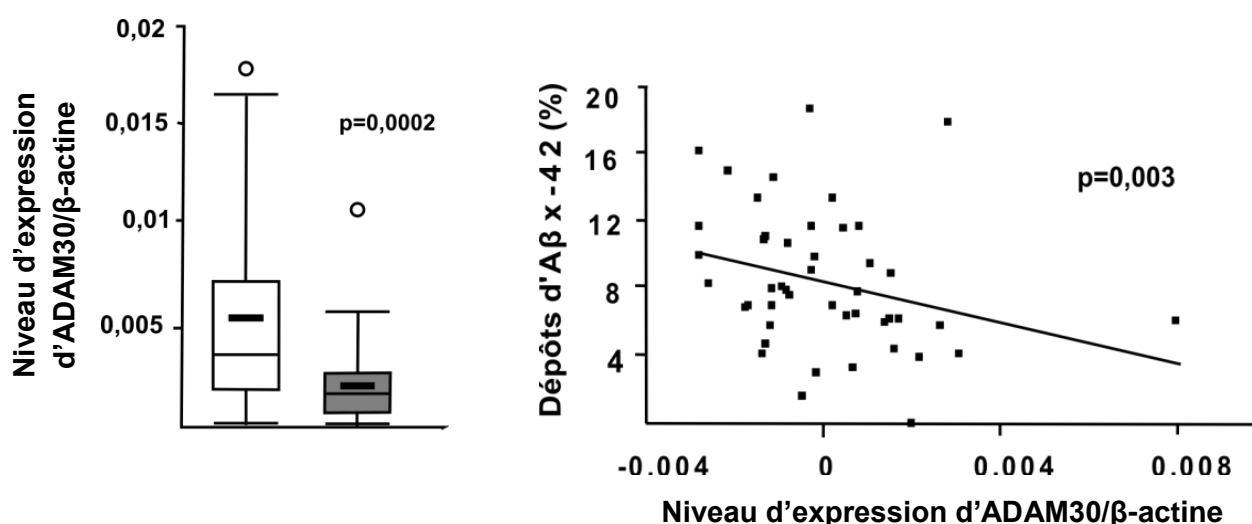


Figure 22. Mesure du niveau d'expression cérébral d'ADAM30 chez l'Homme (A) niveau d'expression d'ADAM30 dans le cerveau de 51 patients atteints de maladie d'Alzheimer (en gris) et 42 cerveaux issus de patients « sains » (en blanc). Les quantifications d'ARNm ont été réalisées en triplicata chez tous les individus (contrôles n=42, cas n=51). Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les cas et les contrôles. Ligne fine: moyenne. Ligne fine haute: inclusion de 75% des individus (premier quartile). Ligne fine basse: inclusion de 25% des individus (troisième quartile). Cercles: individus présentant des valeurs extrêmes (en dehors de la distribution globale). Le test statistique effectué est un test non-paramétrique de Mann-Whitney. (B) Nuage de point montrant l'association des dépôts d'Aβx-42 dans le cerveau des patients Alzheimer avec le niveau d'expression d'ADAM30. Le test statistique utilisé est un test non-paramétrique de Spearman pour B

Pour vérifier la pertinence de cette hypothèse, l'utilisation d'un ShRNA (Short Hairpin RNA) ciblant ADAM et permettant sa sous-expression, conduit à une augmentation de la production de tous les produits du métabolisme de l'APP (Fig.23). Cette expérience n'a été réalisée que dans les cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} car la lignée HEK293 n'exprime pas ADAM30 de manière endogène. Inversement, la sur-expression d'ADAM30 dans les cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} et HEK293-APP^{695wt} provoque une diminution importante de la production des

métabolites de l'APP et plus particulièrement des peptides amyloïdes (Fig.24). Il est important de noter que si la sur-expression ou la sous-expression d'ADAM30 entraînent des modulations dans la production des métabolites de l'APP, elles n'ont aucun impact sur le niveau d'APP total et celui de l'ARNm de l'APP (Fig.23 et 24). ADAM30 ne clive donc pas directement l'APP et ne module pas son niveau d'expression.

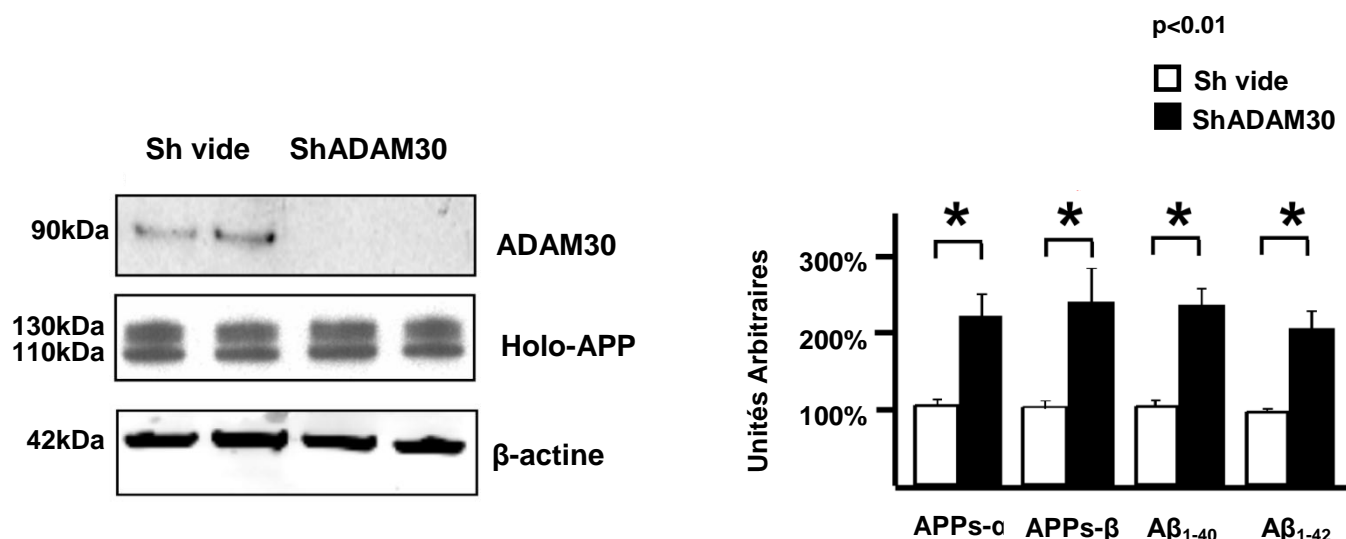


Figure 23. Impact de la sous-expression d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP in vitro. Mesure par WB et ELISAs des APPs-α, APPs-β, Aβ₁₋₄₀ et Aβ₁₋₄₂ après sur-expression d'un vecteur Sh vide ou d'un vecteur contenant un ShRNA dirigé contre ADAM30 dans des cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt}. Quatre expériences indépendantes en duplicata. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

ADAM30 est une protéine transmembranaire de type I de 89kDa. Comme quasiment toutes les autres ADAMs, ses caractéristiques principales sont un domaine catalytique dont l'activité enzymatique est dépendante de la présence d'un ion zinc, et un domaine d'interactions avec les intégrines en partie N-terminale (Fig.20 et 21) (Cerreti *et al.* 1999).

Une mutagenèse dirigée contre les trois histidines nécessaires à la fixation de l'ion zinc dans le domaine catalytique a été réalisée. Cette ADAM30 mutée (appelée ADAM30^{mut}) perd alors son activité catalytique. De façon intéressante, la sur-expression d'ADAM30^{mut} dans les deux modèles cellulaires étudiés ne modifie plus le niveau des métabolites de l'APP (Fig.24). Le site catalytique d'ADAM30 semble donc crucial pour son effet sur le métabolisme de l'APP.

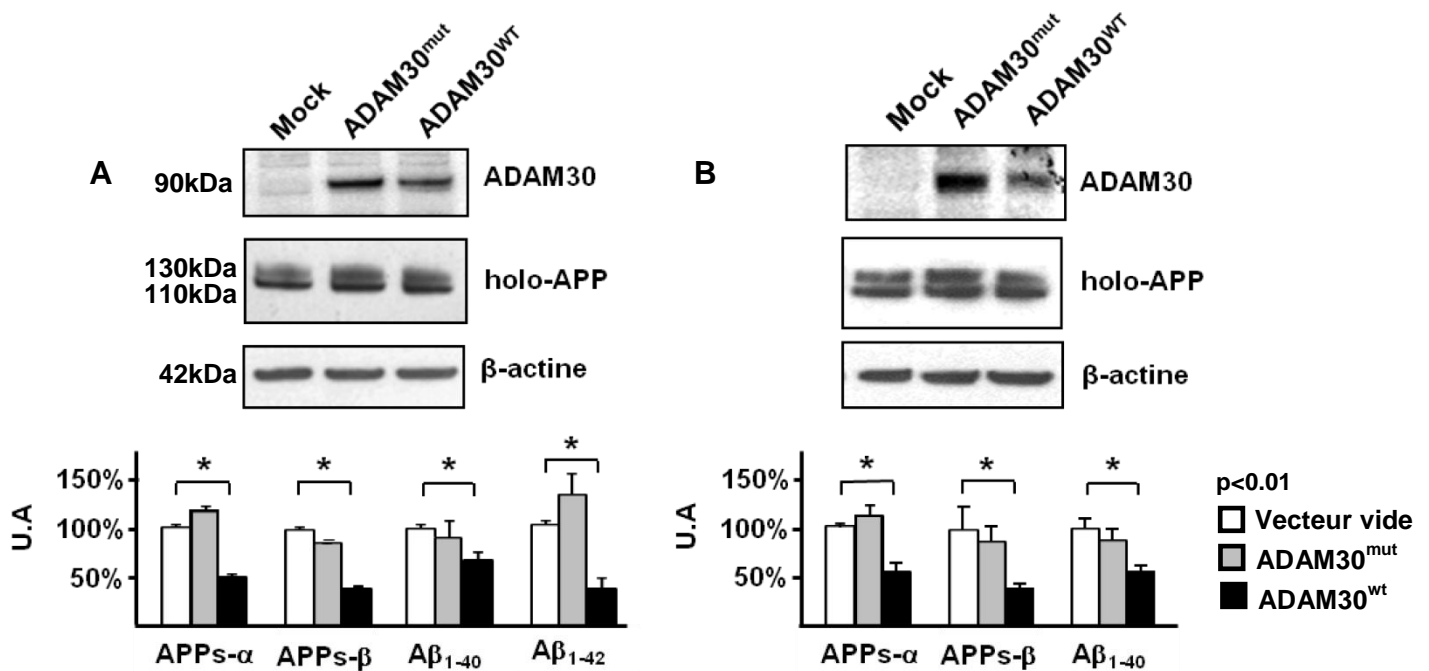


Figure 24. Impact de la sur-expression d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP in vitro. Mesure par WB et ELISAs des APPs-α, APPs-β, Aβ₁₋₄₀ et Aβ₁₋₄₂ après sur-expression d'un vecteur vide d'ADAM30^{wt} ou d'ADAM30^{mut} dans des cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} (A) ou dans des cellules HEK293-APP^{695wt} (B). Quatre expériences indépendantes en duplicata. Les Aβ₁₋₄₂ ne sont pas détectés en ELISA pour les HEK293-APP^{695wt}. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

L'hypothèse la plus simple serait qu'ADAM30 pourrait directement moduler l'activité des sécrétases (α, β et γ). La sur-expression d'ADAM30 entraîne une diminution de tous les produits du métabolisme de l'APP. Or si ADAM30 régulait uniquement l'α-sécrétase, seule une diminution des APPs-α aurait été observée. De plus, il semblerait qu'ADAM30 ne soit pas localisée au niveau de la membrane plasmique excluant ainsi toute possibilité d'interaction directe avec les α-sécrétases. Enfin, la sur-expression d'ADAM30 wt ou mutée ne module pas l'activité des β-sécrétase et γ-sécrétases.

Ces différents résultats laissent donc penser que cette protéine d'intérêt pourrait jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme de l'APP en agissant indirectement sur cette protéine, comme par exemple, en contrôlant une voie de dégradation de l'APP et ainsi avoir un effet protecteur dans la maladie d'Alzheimer.

7. Objectif des recherches

La caractérisation de l'impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP dans nos modèles cellulaires a permis de mettre en lumière son importance pour la régulation du métabolisme de l'APP.

Dans un premier temps, pour se rapprocher des conditions physiopathologiques humaines et mesurer l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP *in vivo*, nous avons développé un modèle de souris triple transgéniques exprimant l'APP695^{SweInd} humain et exprimant de manière conditionnelle l'ADAM30^{wt/mut} humain. Nous avons alors caractérisé nos différentes lignées de souris et avons cherché à mesurer l'impact de la sur-expression d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP *in vivo*. Les précédentes expériences menées au laboratoire ou en collaboration ont pu montrer que l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP n'est pas directe (pas de clivage de l'APP par ADAM30) et est indépendante des sécrétases.

Notre deuxième objectif de travail a donc été d'identifier les substrats d'ADAM30 intervenant dans le métabolisme de l'APP et de déterminer leur implication *in vitro* dans nos modèles cellulaires et *in vivo* dans nos lignées de souris triple transgéniques. Deux substrats potentiels d'ADAM30, la CTSD et l'IRS4, se sont révélés particulièrement intéressants pour notre étude et la caractérisation de leur implication par différentes techniques de biologie moléculaire et cellulaire devrait nous permettre de mieux cerner le mécanisme d'action d'ADAM30 dans la régulation du métabolisme de l'APP.

Une meilleure compréhension des mécanismes régulant le trafic et le métabolisme de l'APP contrôlant son homéostasie, devrait nous permettre de mieux appréhender le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer et ainsi potentiellement ouvrir de nouvelles pistes pour une thérapeutique.

MATERIEL ET METHODES

1. Etude de l'expression d'ADAM30 en modèle murin

1.A. Modèle animal : souris transgéniques

Deux lignées de souris conditionnelles dans un fond génétique C57Bl6N ont été obtenues au près de la société Taconic : les souris ADAM30^{wt/floxstopflox} et les souris ADAM30^{mut/floxstopflox} appelées aussi souris ADAM30^{wt} et ADAM30^{mut} (Taconic, Allemagne). La construction génétique de départ est cernée par deux sites de recombinaison FRT et contient le promoteur GAG, un gène de résistance à la Néomycine, un site LoxP-Stop-LoxP (deux LoxP encadrant un codon Stop) et enfin le gène humain d'ADAM30^{wt} ou d'ADAM30^{mut}. Par électroporation des cellules souches embryonnaires et recombinaison homologue au niveau des sites FRT, cette construction a été insérée dans le locus Rosa26 (région stable et non codante). Après sélection à la néomycine, ces cellules souches modifiées ont été implantées dans des blastocytes qui ont à leur tour été implantés dans l'utérus des mères porteuses. Les souris CamKIIα/Cre dont l'expression du gène Cre est sous contrôle du promoteur CamKIIα (Burgin et al. 1990, Tsien et al, 1996) et les souris APP^{SweInd} dont l'expression du gène APP humain double mutant (mutation de l'APP suédoise K⁶⁷⁰M-N⁶⁷¹L et mutation Indiana V⁷¹⁷F) est sous contrôle du promoteur PDGFβ (Mucke et al, 2000) ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson. Ces deux lignées de souris sont dans un fond génétique C57Bl6J.

Pour éviter une dilution du fond génétique, le premier croisement est effectué entre des souris APP^{SweInd} hétérozygotes et des souris CamKIIα/Cre homozygotes (Fig.25). Trois génotypes de souris hétérozygotes peuvent être obtenus dans la descendance : des souris APP^{SweInd}, des souris CamKIIα/Cre et des souris double transgéniques APP^{SweInd}-CamKIIα/Cre. Ce sont ces dernières qui sont choisies pour être croisées avec des souris ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} hétérozygotes. Huit génotypes différents sont alors obtenus dans la descendance : une lignée sans transgène (WT), trois lignées simple transgéniques (APP^{SweInd}, CamKIIα/Cre et ADAM30^{wt/mut}), trois lignées double transgéniques (APP^{SweInd}-CamKIIα/Cre, ADAM30^{wt/mut} et ADAM30^{wt/mut}-CamKIIα/Cre) et enfin une seule lignée triple transgénique ADAM30^{wt/mut}-APP^{SweInd}-CamKIIα/Cre (Fig.25). Du fait de l'expression de CamKIIα spécifiquement cérébrale, ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} est uniquement exprimée au niveau du cerveau. Toutes les analyses ont été réalisées sur des souris

à l'état hétérozygote uniquement en F1 dans un fond génétique mélangé C57BL6J/N.

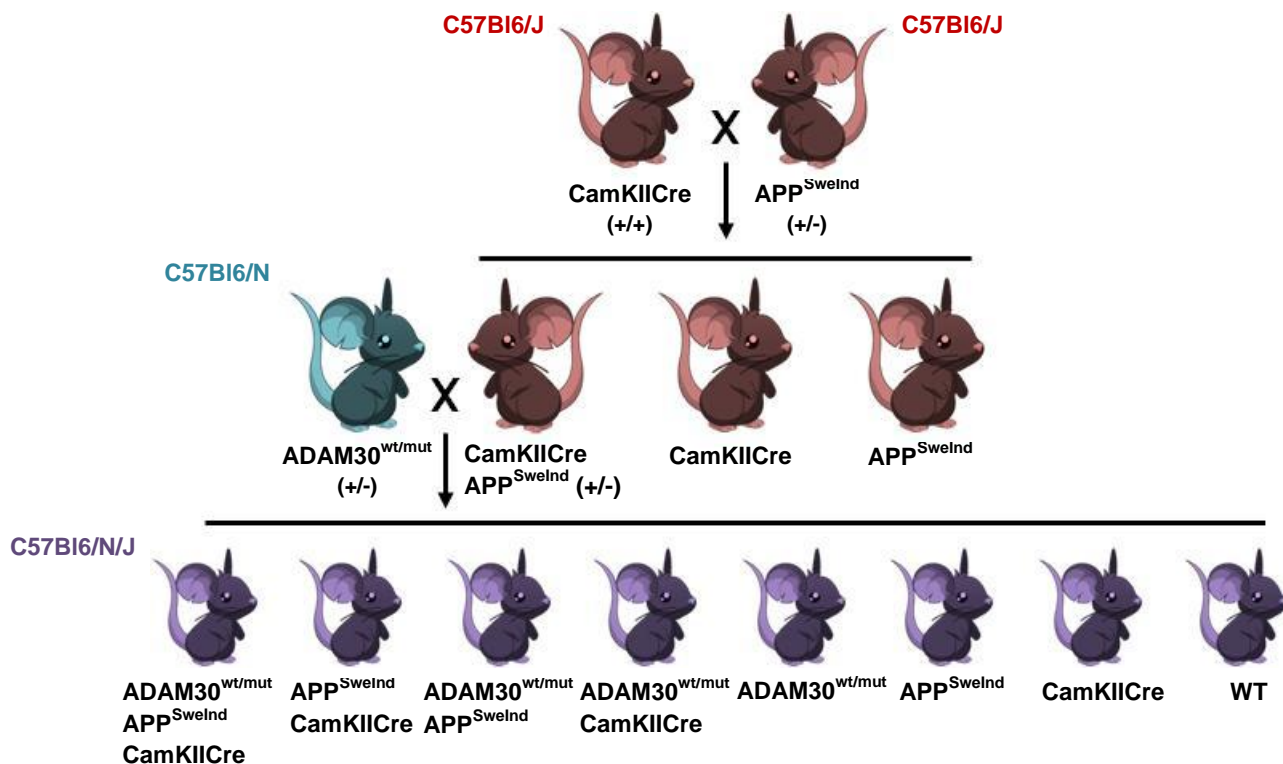


Figure 25. Représentation des différents croisements de lignées de souris effectués pour obtenir nos souris triple transgéniques. Toutes les souris obtenus du croisement de souris *ADAM30* x souris *CamKIIaCre-APP^{SweInd}* sont hétérozygotes et sont dans un fond génétique mélangé C57BL6/J/N

A chaque étape de croisement, les souris ont été génotypées par PCR (Tab.2) à partir de l'ADN extrait de biopsies de queues (5mm maximum) réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane, en suivant le protocole du fournisseur (Laboratoire Jackson).

Les souris sont élevées sur portoir ventilé en animalerie conventionnelle. Elles ont un accès ad libitum à l'eau (via un biberon d'eau stérile) et à la nourriture (régime standard). Les souris issues des croisements triple transgéniques sont étudiées à partir de 10mois \pm 2 semaines. Tous les protocoles ont été validés par le Comité d'Ethique en expérimentation animale du Nord-Pas-de-Calais.

Amorces de génotypage	Sens	Anti-sens
ADAM30^{wt}	CTG CTC ATG AGC TGG GTC A	GTG GAA CCA CAG TCA CAT TCC
ADAM30^{mut}	GCG TTG GAT ATC CAG AGT TAG C	CTA CAG CAA GAC CCA GCT CAA
hAPP	TCT TCT TCT TCC ACC TCA GC	GGT GAG TTT GTA AGT GAT GCC
Cre	TGG GCG GCA TGG TGC AAG TT	CCT GCG GTG CTA ACC AGC GTT
Rosa26	CAT GTC TTT AAT CTA CCT CGA TGG	CTC TTC CCT CGT GAT CTG CAA CTC C

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour génotyper les souris.

1.B. Mesure de la glycémie et du poids

Une semaine avant les sacrifices, toutes les souris sont pesées puis mises à jeun pendant 6H. Au bout de 6H, une première mesure de glycémie des souris est réalisée à l'aide d'un glucomètre Accu-Chek (Roche, Suisse) puis une injection de glucose (5µl/g) est effectuée de façon intrapéritonéale en fonction du poids des souris. La glycémie est alors mesurée à 15min, 30min, 1H, 1H30 et 2H après injection. Après ces mesures, la nourriture est remise à disposition des souris, *ad libitum*.

1.C. Sacrifice des souris et extraction du cerveau

Au bout de 10mois, les souris sont pesées puis anesthésiées par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (30mg/kg). Après ouverture de la cage thoracique, le cœur est perfusé avec 5ml de PBS à 37°C pour éliminer le sang au niveau du cerveau. Les souris sont alors décapitées et une biopsie de queue est prélevée pour vérifier leur génotype. Sur glace, le cerveau est découpé selon une première coupe sagittale sur une matrice. Un des hémisphères est conservé pour les analyses histologiques, l'autre est disséqué sur la matrice pour isoler l'hippocampe et une partie du cortex, qui sont ensuite conservés à -80°C.

1.D. Extraction et quantification des ARNs du cortex (qRT-PCR)

Après extraction, les cortex sont plongés dans l'azote et cryoconservés à -80°C. En suivant les instructions du fournisseur (Invitrogen®), 50mg de cortex ont été homogénéisés dans 1ml de TRIzol® Reagent à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra-Turrax). Après la phase de précipitation, les ARNs totaux contenus dans la phase aqueuse sont purifiés en utilisant le kit NucleoSpin® RNA II extraction kit (Macherey-Nagel®) contenant de la DNase. Les ARNs sont alors resuspendus dans 40µl d'eau RNase-free et stockés à -80°C. Après quantification, les ARNs sont rétro-transcrits en ADNc en suivant les instructions du High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®). Les ADNc obtenus sont utilisés pour réaliser des qPCR (PCR quantitatives). Pour cela, 3µl d'ADNc dilués sont ajoutés dans 10,5µl de tampon de réaction Brilliant II SYBR® Green QPCRMaster Mix (Agilent Technologies®) contenant des amorces de qPCR (Tab.3).

Amorces de RT-qPCR	Sens	Anti-sens
Gapdh	GGC AAG CCC ATC ACC ATC TT	GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA
NeuN	GGC AAT GGT GGG ACT CAA AA	GGG ACC CGC TCC TTC AAC
Adam30^{wt}	TGA TGC TCT TGC ATG GTC GTT TGG	CCT GAG CCC ATG ATG CAA TTA AGC C
Adam30^{mut}	GCG TTG GAT ATC CAG AGT TAG C	CTA CAG CAA GAC CCA GCT CAA
App695^{Swelnd}	TCT TCT TCT TCC ACC TCA GC	GGT GAG TTT GTA AGT GAT GCC
Cre	AAC GCT GGT TAG CAC CGC AGG	CCC TTC CAG GGC GCG AGT TG
Cathepsine D	GCC AAG TTT GAT GGC ATC TTG	AAA GAC CGG AAG CAC GTT GT
Bace1	AGG GCT TGC ACC TGT AGG AC	GCC TGA GTA TGA CGC CAG TA

Tableau 3 Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour la qPCR sur les différentes lignées de souris.

Ces amorces sont fournies par Eurogentec. L'expression des gènes correspondant à la quantité d'ARNm est normalisée à l'aide de deux gènes de ménages : NeuN et le gène de la GAPDH (finalement seul le gène NeuN a été retenu).

1.E. Mesure des A β 42 et A β 40 par ELISA et Alpha Lisa

Après extraction, les hippocampes sont plongés dans l'azote et cryoconservés à -80°C puis homogénéisés dans un tampon guanidium ([Johnson-Wood et al, 1997](#)). Les niveaux d'A β 42 et d'A β 40 hippocampiques sont quantifiés de deux manières différentes. Les A β 42 sont dosés grâce au kit ELISA A β ₁₋₄₂ d'Innogenetics en suivant leurs instructions alors que les A β ₁₋₄₀ sont quantifiés par un kit Alpha Lisa A β ₁₋₄₀ de chez PerkinElmer (France). Après extraction depuis l'hippocampe, les concentrations protéiques sont déterminées par dosage au moyen du réactif de Bradford (Bio-Rad Laboratories) Les tests statistiques sont réalisés avec un test non-paramétrique de Mann-Whitney.

1.F. Histologie

L'histologie sur les hémisphères cérébraux de souris APP^{SweInd}, ADAM30^{wt}/APP^{SweInd} et ADAM30^{wt}/APP^{SweInd}/Cre a été effectuée par un service de neurohistologie à haut-débit (NeuroScience Associates). Ces hémisphères sont inclus dans une matrice solide verte (Multibrain technology) et coupé selon l'axe rostrocaudal. Pour chaque cerveau, trois séries de 100 coupes coronales de 30 μ m d'épaisseur sont réalisées pour effectuer trois immunohistochimies différentes. Une série est destinée au marquage par l'anticorps 6E10 qui reconnaît les peptides amyloïdes. Les deux autres séries sont conservées pour mener d'autres expériences. Des photographies des blocs d'inclusions sont prises avant chaque découpe (résolution latérale de 13 μ m). Enfin, les images d'histologie sont numérisées grâce à un scanner à fond plat affichant une résolution latérale de 5 μ m (ImageScanner III, GE Healthcare).

1.G. Reconstruction des images de cerveaux en 3D

Collaboration avec le laboratoire CEA, I2BM du MIRcen (Fontenay-aux-Roses)

Toutes les étapes du processus d'obtention des images sont effectuées en utilisant le BrainRAT 3D-HAPi pipeline ([Dubois et al. 2007](#); [Vandenberghe et al. 2014](#)) ainsi

qu'un logiciel de traitement d'images dédié ([BrainVISA](http://brainvisa.info), <http://brainvisa.info>). Pour éviter des biais liés aux expérimentateurs connaissant les souris, toutes les analyses d'images sont réalisées « à l'aveugle » sans connaissance du génotype des animaux utilisés. Pour chaque cerveau, les photos du bloc d'inclusion et les images d'histologie sont compilées ([Fig.26](#)). Le tissu cérébral est automatiquement délimité sur les photos des blocs d'inclusions puis masqué pour supprimer le fond. Les images sont prises de la même manière, coupes après coupes toujours selon la même position et les mêmes axes, puis compilées. La compilation de toutes les images a permis une reconstitution des cerveaux reprenant la forme originale des cerveaux congelés. Ces cerveaux virtuels en 3D servent alors de support pour les images d'histologie. Après la réalisation de toutes les coupes et images histologiques, les images sont superposées aux photos des coupes des blocs d'inclusions pour corriger la déformation des cerveaux provoquée par les expériences d'histologie et pour reconstituer un volume 3D histologique cohérent (résolution xyz: $5 \times 5 \times 90 \mu\text{m}^3$ pour les volumes histologiques marqués avec l'anticorps monoclonal 6E10). Pour chaque animal, le volume histologique du marquage avec l'anticorps 6E10 et le cerveau virtuel issu des coupes du bloc d'inclusion sont superposés en utilisant les mêmes références spatiales. L'image obtenue correspond à une projection en 3D des dépôts amyloïdes présent dans le cerveau de l'animal reconstitué en 3D.

1.H. Quantification des dépôts amyloïdes des coupes histologiques

Collaboration avec le laboratoire CEA, I2BM du MIRcen (Fontenay-aux-Roses)

Sur les volumes histologiques du marquage avec l'anticorps 6E10, Les agrégats de peptides amyloïdes sont numériquement isolés par un classifieur Bayésien (sans a priori) ([Chubb et al., 2006](#)). Chaque voxel (unité 3D en informatique) est classé soit positif au marquage des plaques amyloïdes, soit en tissu non marqué, soit en fond. Le classement est effectué en prenant compte de deux paramètres : (1) l'intensité de la coloration du voxel (ensemble des trois couleurs rouge, vert et bleu) (2) la moyenne de l'intensité de la coloration de la périphérie du voxel (chaque voxel possède 4 voisins sur un même plan et 6 en 3D). En suivant le protocole de [Lebenberg et al. de 2010](#), un atlas d'hémi-cerveaux de souris est établi en prenant comme base l'atlas 3D de cerveau de souris du MRI

(http://www.mouseimaging.ca/technologies/C57Bl6j_mouse_atlas.html, Dorr et al. 2008). Pour cela, des transformations non-linéaires sont estimées pour chaque cerveau (en utilisant le MRI) puis appliquées à chaque volume de l'atlas correspondant. Le pourcentage du volume occupé par le marquage au 6E10 est rapporté à chaque volume de l'atlas. Bien que ces analyses soient automatisées, chaque étape de l'enregistrement des coupes et de l'isolation des colorations sont vérifiées visuellement.

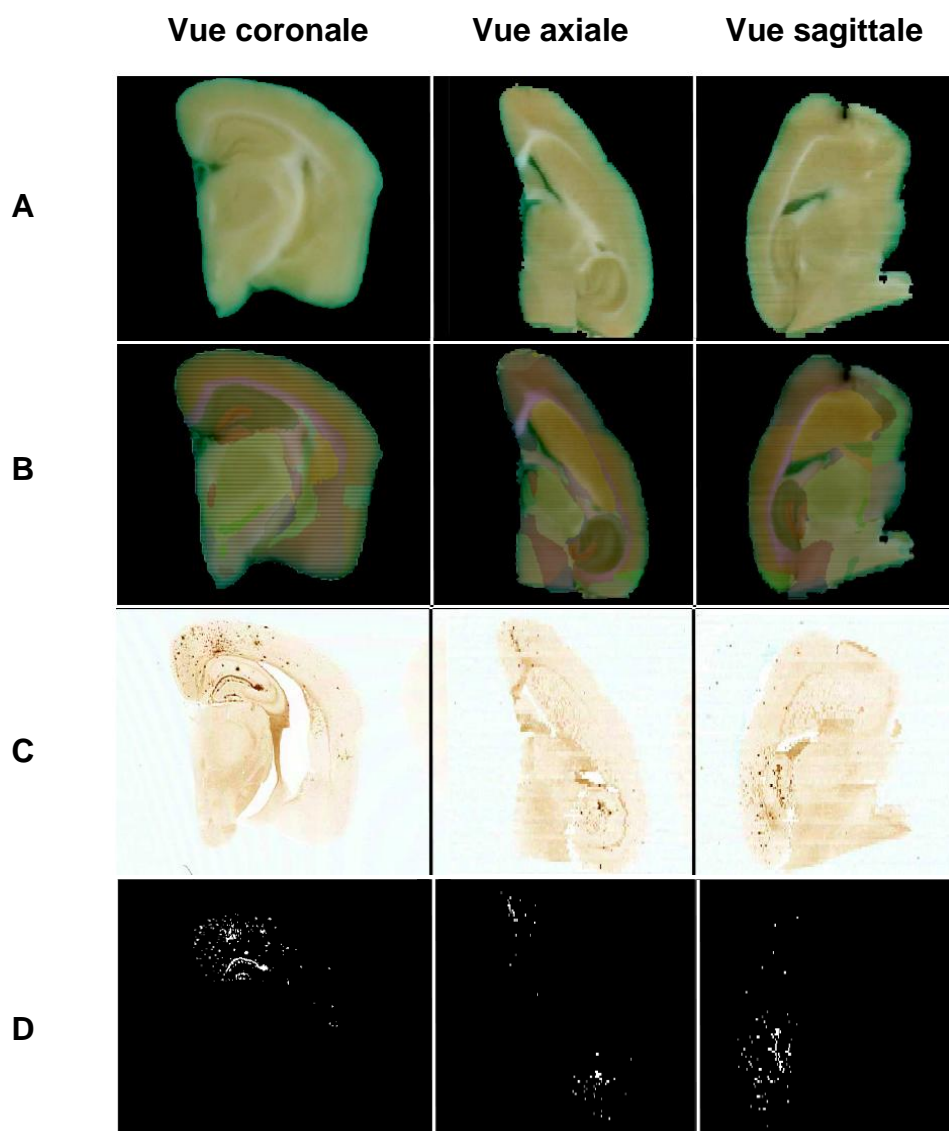


Figure 26. Etapes de la reconstitution des cerveaux de souris en 3D. (A) Photos compilées des coupes du bloc d'inclusion reformant le volume initial de l'hémisphère. (B) Identification des différentes zones cérébrales sur le volume reconstitué en prenant comme base l'atlas 3D de cerveau de souris du MRI. (C) Compilation des différentes immunohistochimies (avec l'anticorps 6E10) en prenant comme base le volume reconstitué en 3D du bloc d'inclusion. (D) Identification et isolation numérique des dépôts amyloïdes à partir des immunohistochimies précédentes.

2. Identification des substrats d'ADAM30

2.A. Identification des substrats d'ADAM30 par COFRADIC, SILAC et marquage N-terminal des protéines

Collaboration avec le laboratoire VIB de Gand

Pour les expériences de COFRADIC (COmbined FRActional Diagonal Chromatography) (Van Damme *et al.* 2009), deux lignées HEK293-APP^{695wt} exprimant stablement ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} (HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} et HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{mut}) ont été générées. Les cellules HEK293 ont l'avantage de ne pas avoir d'expression d'ADAM30 endogène. Ces cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} et HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{mut} sont cultivées dans un milieu DMEM:F12 (1:1) comprenant 10% de sérum de veau fœtal, Pénicilline/Streptomycine et 100ng/ml de puromycine (Fig.72). Après quelques passages, les cellules sont cultivées pendant une semaine dans un milieu SILAC (DMEM:F12 1:1 comprenant du sérum de veau fœtal dialysé, de la Pénicilline/Streptomycine et 100ng/ml de puromycine) dans lequel est ajouté de l'Arginine ¹²C⁶ pour les cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{mut} ou de l'arginine ¹³C⁶ pour les cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} (arginines « alourdies » en isotopes non radioactifs du carbone) (Fig.27.A.). Lors de la synthèse protéique, les cellules vont incorporer ces acides aminés, toutes les néo-protéines seront donc marquées. Au bout d'une semaine, les cellules sont trypsinisées et centrifugées (Fig.27.A.). Le culot est rincé au PBS puis lysé dans un tampon contenant du CHAPS. Pour effectuer une lyse complète, les échantillons sont soumis à trois cycles de chocs thermiques. Après mesure de la concentration en protéines, les lysats des cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} et HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{mut} sont mélangés à part égale (1:1) (Fig.27.A.). Ce mix est alors analysé par COFRADIC N-terminal. Pour cela, les premiers groupements amine des lysines et la partie N-terminale des protéines sont acétylées en utilisant de l'ester N-hydroxysuccinimide de tri-deutéro-acétate (AcD3). Les protéines sont ensuite digérées par de la trypsine qui ne clive que la partie C-terminale des protéines jusqu'à une arginine et ne reconnaît pas les lysines acétylées. Les peptides N-terminaux restant (ainsi que les peptides internes isolés de façon concomitante) dans le lysat commencent donc tous par une arginine marquée par un

$^{12}\text{C}^6$ si elles proviennent de cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{mut} ou par un $^{13}\text{C}^6$ si elles proviennent de cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt}. La digestion à la trypsine génère donc deux groupes de peptides : un groupe présentant une extrémité N-terminale acétylée et un groupe avec un groupement amine en premier, issus de la digestion tryptique. Ces derniers sont enrichis au travers d'une résine SCX par un fort échange de cation à pH3 puis séparés par une première RP-HPLC (Fig.27.A.) (Valkenborg *et al.* 2009).

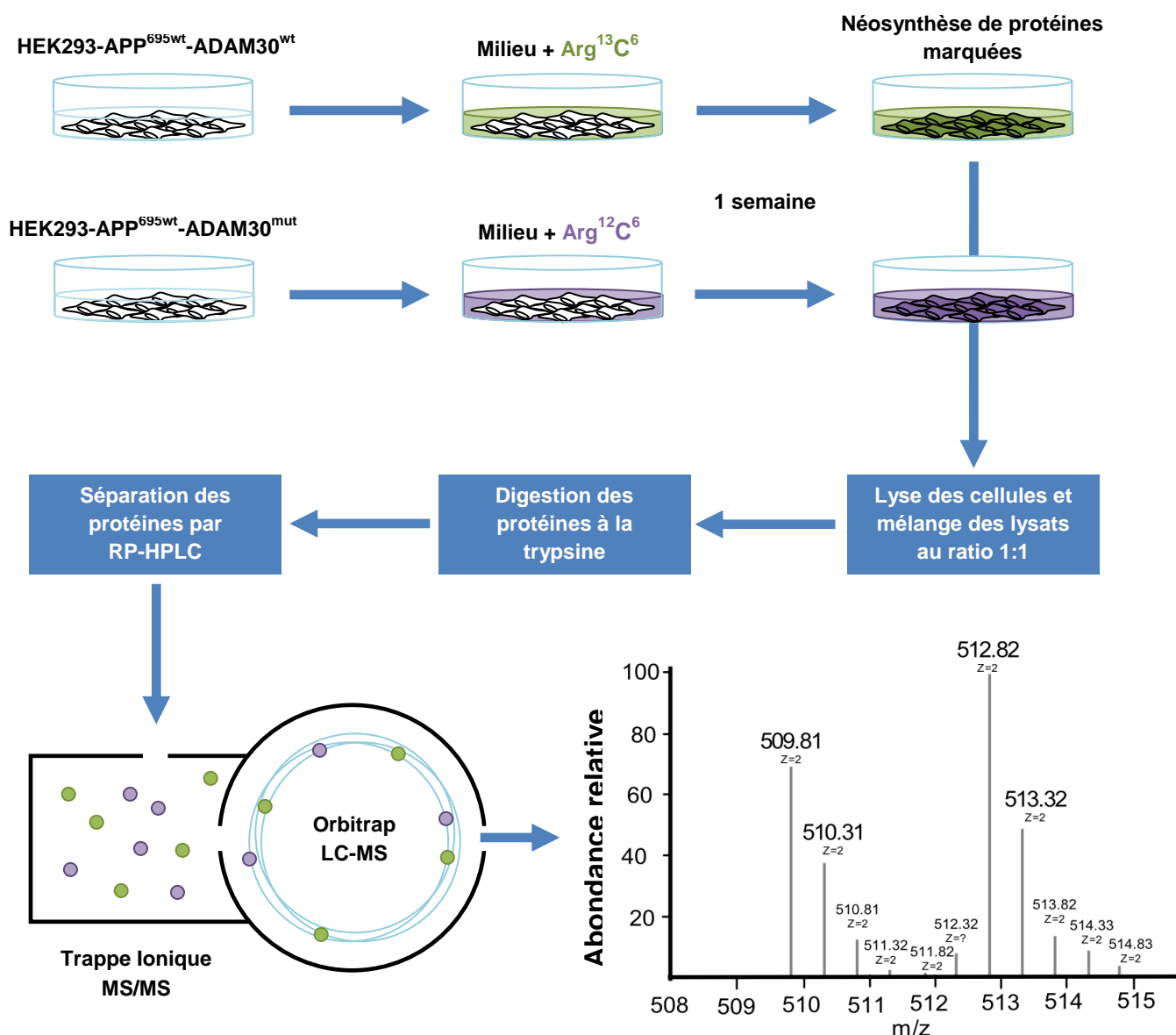


Figure 27.A. Schématisation des différentes étapes de l'identification des substrats d'ADAM30 en associant COFRADIC, SILAC et marquage N-terminal des protéines. Les deux lignées sont cultivées en présence d'un milieu enrichi en arginine possédant un carbone 13 pour la lignée sauvage et 12 pour la lignée mutée. Après une semaine permettant la néosynthèse des protéines alors marquées, les cellules sont lysées puis mélangées au ratio 1:1. Une digestion tryptique (coupant après les lysines et les arginines) est effectuée. Le lysat est ensuite traité à l'AcD3 permettant une acétylation de la partie Nter des peptides. Après purification par RP-HPLC (chromatographie en phase liquide) de ces peptides doublement marqués, leur analyse est effectuée par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Le spectre de droite représente les différents peptides obtenus pour la Cathepsine D, les pics impairs correspondent aux peptides provenant de la lignée mutante, les pics pairs proviennent de la lignée sauvage.

Les différentes fractions de peptides ainsi obtenues sont traitées par du TNBS qui modifie le premier groupement amine et donc augmente la rétention de ces peptides sur la colonne RP-HPLC. Cette fraction de peptides modifiés par le TNBS est ensuite repassée plusieurs fois dans la colonne RP-HPLC. Les peptides N-terminaux ainsi obtenus sont isolés puis analysés par spectrométrie de masse en tandem LC-MS/MS en utilisant le spectromètre de masse LTQ Orbitrap (Fig.27.A.). Les peptides obtenus sont alors identifiés par l'algorithme Mascot puis quantifiés par le logiciel Mascot Distiller.

Comme tous les peptides N-terminaux n'ont qu'une seule arginine localisée à leur extrémité C-terminale et marquée soit par du $^{12}\text{C}^6$ ou du $^{13}\text{C}^6$, et que le mix de protéines des deux lignées cellulaires est préparé à parts égales, la plupart des peptides doivent avoir un ratio $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ égal à 1:1. Cependant, les peptides correspondant aux protéines clivées par ADAM30 doivent être absents de l'échantillon provenant des cellules exprimant un ADAM30^{mut}. Grâce à cette différence de profil peptidique, ces peptides N-terminaux spécifiques d'ADAM30 n'apparaissent que dans la fraction marquée au $^{13}\text{C}^6$ avec un ratio 12C:13C significativement en dessous de 1. De par cette méthode, nous avons pu identifier 2,238 protéines potentielles. Seulement, le logiciel Mascot Distiller ne quantifie pas tout le temps correctement les peptides, dont notamment les peptides présentant un groupement NH_2 du côté C-terminal (issus de la digestion trypsique). Il a donc été nécessaire d'écarter ces peptides manuellement. Nous avons finalement choisi le test statistique de Huber ou distribution de Huber permettant de ne sélectionner que les peptides N-terminaux dont le ratio descendait significativement en dessous de 0,707 (Fig.27.B.) (Staes et al., 2008).

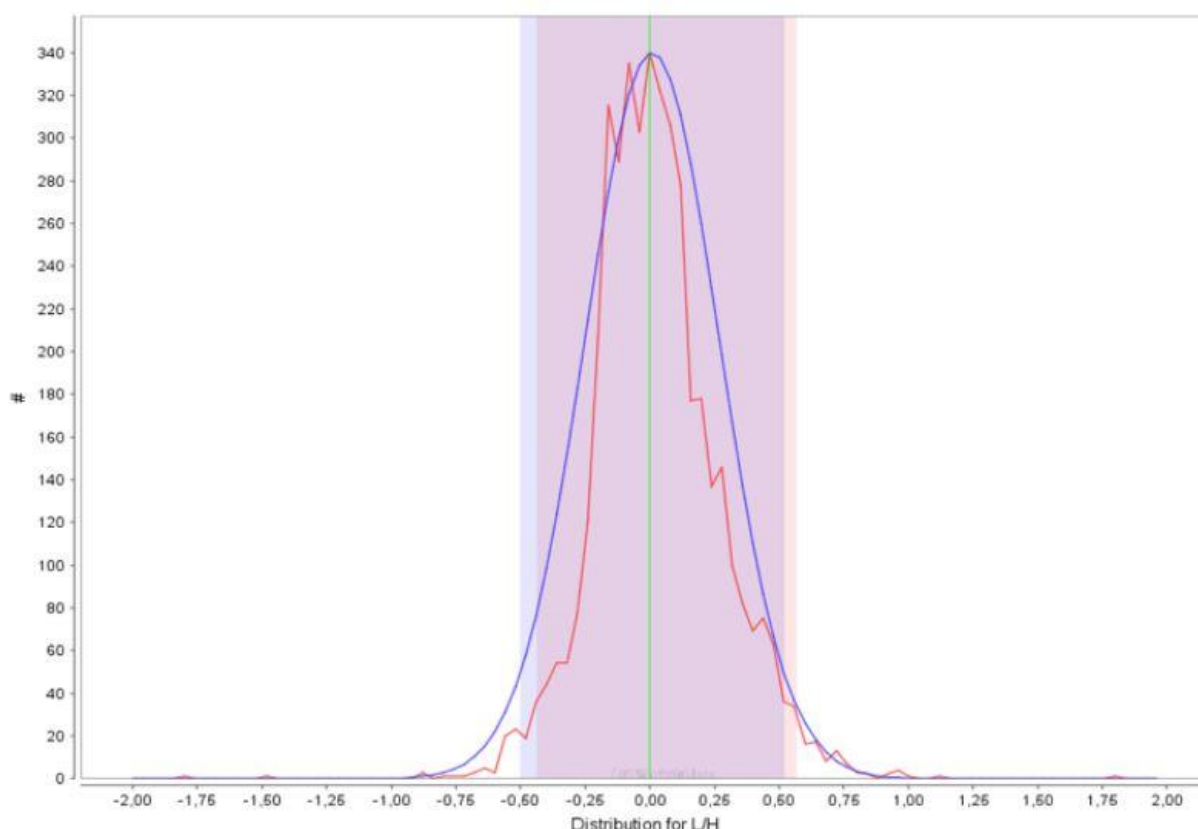


Figure.27.B. Distribution de Huber. La ligne rouge correspond à la distribution réelle ou « brute » des peptides. La ligne bleue représente la distribution des peptides normalisée. Les zones foncées et claires correspondent respectivement à l'intervalle de confiance à 95% et 99%. L'intervalle à 95% a été utilisé pour déterminer si la différence de ratio observée d'un peptide donné par rapport aux autres peptides est statistiquement valable.

2.B. Production des protéines recombinantes ADAM30^{wt} et ADAM30^{mut}

Les protéines recombinantes ADAM30^{wt} et ADAM30^{mut} ont été synthétisées par Genscript (Piscataway, USA) pour les expériences de mesure d'activité de la CTSD. Avant d'être sous-clonées dans un vecteur d'expression bactérien, le pGS21a, les expressions d'ADAM30^{wt} et d'ADAM30^{mut} sont augmentées par une optimisation gène-codon. Les bactéries E.coli ArcticExpress (DE3) sont transformées avec les plasmides recombinant précédemment obtenus. Une seule colonie positive a été incubée dans du milieu LB contenant un antibiotique, l'ampicilline, sous agitation à 37°C à 200rpm. Une fois la densité bactérienne requise atteinte (OD=0.60.8 à 600nm) de l'IPTG est introduit pour l'induction. L'expression est alors vérifiée sur gel SDSPAGE et la purification est effectuée à l'aide d'un Tag Histidine (His-Tag). Grâce au gel coloré au bleu de Coomassie, la pureté a été estimée à près de 80% de protéines recombinantes.

2.C. Mesure de l'activité de la CTSD *in vitro* et *in cellulo*

L'activité de la Cathepsine D (CTSD) humaine recombinante (R&D Systems, Lille, France) a été mesurée par clivage de son substrat préférentiel. Ce peptide de synthèse, Mca-PLGL-Dpa-AR-NH₂, est fluorogénique (R&D Systems). La CTSD (16µg/ml) est préincubée à 37°C pendant 30 min avant d'être diluée au 8^e dans un tampon contenant 50mM de Tris-HCl pH7,5 et 300mM de NaCl. Dans les puits d'une plaque 96 puits noire opaque (Corning, Amsterdam, Pays-Bas), 25µl de CTSD sont incubés avec le substrat à 37°C pendant 40min. Le volume final de la solution incubée atteint 100µl comprenant 0,5µg/ml de CTSD et 10µM de substrat dans un tampon composé de 0,1M d'acétate de sodium et 0,2M de NaCl à pH3,5. La fluorescence émise par clivage du substrat par la CTSD a été mesurée par un lecteur de plaque Victor3 V1420 (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) à une longueur d'onde d'excitation à 340nm et une émission à 410nm. La fluorescence du substrat blanc est soustraite. Pour évaluer l'effet d'ADAM30^{wt} ou d'ADAM30^{mut} sur l'activité de la CTSD, la CTSD est préincubée avec 84µg/ml de chaque protéine avant d'être diluée et incubée avec son substrat. L'activité de la CTSD mesurée est comparée avec celle de la CTSD préincubée avec 84µg/ml d'albumine de sérum de bœuf (Sigma, Lyon, France).

Pour mesurer l'activité intracellulaire de la CTSD, les cellules HEK293-APP^{695WT} sontensemencées à raison de 300000 cellules par puits puis transfectées au bout de 24H avec le vecteur vide pcDNA-Mock, le pcDNA-ADAM30^{wt} ou le vecteur pcDNA-ADAM30^{mut}. Après 48H, les cellules sont lysées et l'activité de la CTSD est mesurée de deux façons indépendantes : (1) au cours du temps, toutes les 5min pendant 30min (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min) ou (2) en mesure terminale au bout de 30min, grâce au kit fluorométrique SensoLyte[®] Cathepsin D assay (AnaSpec[®], USA). Toutes les expériences sont réalisées au moins en triplicata, et toutes les mesures sont effectuées deux fois pour chaque échantillon. Enfin, un test T bilatéral est effectué pour comparer les résultats.

2.D. Mesure de l'activité de la CTSD *ex vivo*

Après extraction, les cortex des souris sont plongés dans l'azote et cryoconservés à -80°C. Les échantillons de cortex sont homogénéisés dans un tampon du kit Sensolyte 520 cathepsin D assay kit (Anaspec[®], USA) contenant du DTT

(dithiothreitol), puis broyés à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra-Turrax). Après 10min de centrifugation des surnageants à 12000rpm à 4°C, le kit SensoLyte® Cathepsin D assay kit (AnaSpec®) est utilisé pour analyser ces surnageants en suivant les instructions du fournisseur. L'activité de la Cathepsine D est alors mesurée de deux manières indépendantes réalisées trois fois chacune (triplicata) : une mesure au cours du temps, toutes les 5min pendant 30min et une mesure terminale qui comptabilise la totalité de l'activité CTSD sur 30min. Chaque mesure est effectuée deux fois pour un même échantillon de cortex et le résultat est normalisé par rapport au poids du cortex et à la concentration en protéines. Deux tests statistiques sont utilisés pour la comparaison des résultats : un test T bilatéral pour les mesures au cours du temps et un test non-paramétrique de Mann-Whitney pour la mesure terminale.

3. Analyses du métabolisme de l'APP en fonction de l'expression d'ADAM30^{wt/mut}, de la CTSD ou d'IRS4^{wt/mut}

3.A. Modèles cellulaires

Deux modèles cellulaires complémentaires sont utilisés : les cellules SKNSH-SY5Y sont issues de neuroblastomes et les cellules embryonnaires humaines de rein HEK293. Ces cellules ont été précédemment transfectées dans notre laboratoire stablement avec l'ADNc de l'APP^{695wt}. Les lignées SKNSH-SY5Y et SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} sont cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco®, USA) auquel est ajouté 10% de sérum de veau fœtal, 50 U/ml de pénicilline/streptomycine (Invitrogen®, USA), 2mM de L-glutamine et 1mM de NEAA (acides aminés non essentiels) (Invitrogen®, USA). Les lignées HEK293 et les HEK293-APP^{695wt} sont cultivées dans un milieu DMEM F-12 avec les mêmes adjuvants que pour les SKNSH-SY5Y sauf les NEAA. Toutes les lignées cellulaires utilisées sont cultivées en incubateur à 37°C dont l'atmosphère est saturée en humidité et sous 5% de CO₂.

Nous avons également généré deux lignées cellulaires HEK293 exprimant stablement l'APP^{695wt} et ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut}. Pour cela, les cDNAs d'ADAM30^{wt} et d'ADAM30^{mut} sont excisés de leur vecteur pcDNA3.1 en utilisant les enzymes *HindIII* et *NotI* puis insérés dans un nouveau vecteur, le pLPCX (Clontech) via les même enzymes. Les rétrovirus utilisés pour réaliser ces lignées stables sont transfectés dans des cellules HEK293-APP^{695wt} comme décrit précédemment ([Augert et al. 2009](#)). Vingt-quatre heures après leur ensemencement à raison de 2,6 millions de cellules par boîte de 10cm² précoatées à la poly-lysine, les cellules HEK293-APP^{695wt} sont transfectées avec de l'Exgen 500 (Euromedex). Pour chaque condition, 24µl d'Exgen 500 sont mélangés à 600µl de NaCl 0,9% puis le tout est incubé pendant 10min. Cette solution est alors mélangée avec une seconde solution comprenant 600µl de NaCl 0,9%, 1µg de VSV et 5µg de vecteur rétroviral. Après 30min d'incubation, la solution est ajoutée dans le milieu Opti-Mem (Invitrogen) des cellules HEK293-APP^{695wt}. Après 6h, le milieu est éliminé puis remplacé par le milieu de culture utilisé pour nos cellules HEK293 et les HEK293-APP^{695wt} normales. Après deux jours de culture, le surnageant des cellules contenant les rétrovirus néo-synthétisés est récupéré, filtré (filtre de 0,45µm ; Millipore), mélangé (1 :1) avec un nouveau milieu qu'avec 8µg/ml de polybrène. Enfin, ce surnageant contenant les virus est ajouté au milieu de nos cellules et laissé sous incubation pendant 7 h. Le milieu de ces cellules est ensuite remplacé par un milieu de culture neuf utilisé pour nos cellules HEK293 et les HEK293-APP^{695wt}. La sélection eucaryotique débute 48h après infection à l'aide de la Puromycine à raison de 1,5µg/ml.

3.B. Construction des plasmides

L'ADNc de l'APP^{695wt} a été précédemment obtenu dans notre laboratoire. Il est contenu dans un plasmide pcDNA3.1, vecteur d'expression mammalien possédant un promoteur fort et constitutif, le CMV (Cytomégalovirus). Dans ce vecteur sont aussi présents le gène de résistance à l'ampicilline et un site de clonage multiple permettant l'insertion de l'ADNc APP^{695wt} ([Vingtdeux et al. 2007](#)).

Pour obtenir le vecteur pcDNA-ADAM30^{wt}, l'ADNc d'ADAM30^{wt} a été synthétisé par la société TrueClone[®] et sa séquence validée par séquençage direct. Enfin, l'ADNc d'ADAM30^{wt} est inséré par sous-clonage dans un vecteur d'expression mammalien,

le pcDNA3.1(+), en utilisant les sites de restrictions générés par l'enzyme de restriction Not I (Invitrogen®, USA).

Le vecteur pcDNA-ADAM30^{wt/mut}-GFP est créé par sous-clonage de l'ADNc de la GFP (Green Fluorescent Protein) dans le vecteur pcDNA3-ADAM30^{wt/mut} en utilisant les sites de restrictions générés par Hind III et EcoR V. Une fois transfecté, ce vecteur permet l'expression de protéines de fusion ADAM30^{wt}-GFP ou ADAM30^{mut}-GFP dont la partie N-terminale correspond à la protéine ADAM30^{wt/mut} et la partie C-terminale à la GFP.

Le vecteur pCMV6-XL5 contenant l'ADNc d'IRS4 est obtenu auprès de la société Origene®.

3.C. Mutagenèse dirigée

ADAM30^{mut} a été précédemment obtenue à partir du vecteur matrice pcDNA3-ADAM30^{wt}. Une mutagenèse dirigée des Histidines en Leucines en position 338, 342 et 348 permet d'inactiver le site catalytique d'ADAM30.

En suivant le même protocole, les mutants APP⁶⁹⁵ sont générés à partir du vecteur matrice pcDNA3-APP^{695wt}. En mutant la Lysine en position 688 en codon stop, la protéine APP exprimée présente une extrémité C-terminale tronquée de ses 8 derniers acides aminés, l'APP^{695mut} obtenu est ainsi nommé APPΔC8. Aussi de la même manière, l'APP^{F690S} est obtenu à partir de la mutation de la Phénylalanine en Sérine position 690 et l'APP^{E691V} est obtenu à partir de la mutation de l'acide Glutamique et Valine en position 691.

Toujours sur le même principe, le mutant IRS4 est obtenu à partir d'une mutagenèse dirigée dans le vecteur matrice pCMV6-XL5-IRS4^{wt}. Deux mutations séquentielles sont nécessaires pour réaliser l'IRS4^{mut} : une première de la Glycine en Alanine en position 595 suivie d'une seconde de la Glycine en Alanine en position 597 sur la séquence d'IRS4^{wt}.

Toutes les mutagenèses dirigées sont effectuées en utilisant le kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene®) en respectant les indications du fournisseur. Enfin, les séquences mutées sont vérifiées et validées par séquençage direct.

Amorces de mutagenèse	Sens	Anti-sens
AppΔC8	CGG CTAC GAA AAT CCA ACC TAC TAG TTC TTT GAG CAG ATG CAG	CTG CAT CTG CTC AAA GAA CTA GTA GGT TGG ATT TTC GTA GCC G
App-F690S	CCA ACC TAC AAG TTC TCT GAG CAG ATG CAG AAC TAG	CTA GTT CTG CAT CTG CTC AGA GAA CTT GTA GGT TGG
App-E691V	CCT ACA AGT TCT TTG TGC AGA TGC AGA ACT AGA AGG GCG	CGC CCT TCT AGT TCT GCA TCT GCA CAA AGA ACT TGT AGG
Irs4-G596A-G597A	GGC AAA GGC TCA GGA AGT GCG AAA GCA TCC GAT GGT C	CAC CAT CGG ATG CTT TCG CAC TTC GTG AGC CTT TGC C

Tableau 4. Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

3.D. Transfections

Les transfections transitoires sont réalisées en suivant le protocole de l'Exgen500 pour les cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} (Fermentas®, France) et celui du Fugene-HD pour les cellules HEK293/HEK293-APP^{695wt} (Roche Diagnostics®, Suisse) en respectant les indications des deux fournisseurs.

Pour l'analyse du métabolisme de l'APP, les lignées cellulaires SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} et HEK293-APP^{695wt} sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 300000 cellules par puits et transfectées au bout de 24H avec 500µg de vecteur vide pcDNA ou pcDNA-Mock, de vecteur pcDNA-ADAM30^{wt} ou encore de vecteur pcDNA-ADAM30^{mut}.

Pour l'analyse du métabolisme de l'APPΔC8, APP^{F690S} et APP^{E691V}, les cellules HEK293 sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 300000 cellules par puits et transfectées au bout de 24H avec 250µg de pcDNA-APP^{695wt}, pcDNA-APPΔC8, pcDNA-APP^{F690S} ou encore de pcDNA-APP^{E691V} et 250µg de pcDNA-Mock ou de pcDNA-ADAM30^{wt}.

Pour mesurer l'impact d'IRS4 sur le métabolisme de l'APP, les cellules HEK293 sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 300000 cellules par puits et transfectées

au bout de 24H avec 250µg de vecteur pcDNA-ADAM30^{wt} ou de pcDNA-ADAM30^{mut} ainsi que 250µg de pCMV6-XL5-IRS4^{wt} ou de pCMV6-XL5-IRS4^{mut}.

Quarante-huit heures après transfection, les surnageants de culture sont prélevés pour une quantification des produits sécrétés du métabolisme de l'APP. Les cellules sont également lysées pour mesurer par western blot l'expression d'ADAM30^{wt/mut}, de l'APP^{wt/mut} ou d'IRS4^{wt/mut} ainsi que les différents métabolites de l'APP non sécrétés. Toutes les expériences sont réalisées au moins en triplicata (trois expériences indépendantes de transfection pour chaque mutant), et toutes les mesures ont été faites deux fois pour chaque échantillon. Enfin, un test T bilatéral a été effectué pour comparer les résultats.

3.E. Mesure de l'internalisation de l'APP

Les cellules HEK293-APP^{695wt} sont transfectées avec le vecteur pcDNA-ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} dans des plaques de 100mm². Quarante-huit heures après transfection, pour marquer l'APP à la surface des cellules, les cellules sont mises à incuber avec l'anticorps 6E10 ciblant l'APP pendant 1h à 4°C (voir tableau 3 pour l'anticorps). Pour stopper l'internalisation de l'APP, les cellules sont laissées à 4°C puis fixées avec du paraformaldéhyde en suivant le protocole d'immunofluorescence (voir section 3.C.). Pour induire l'internalisation de l'APP, ces cellules ont été incubées à 37°C pendant 5min, 15min ou 30min puis fixées avec du paraformaldéhyde en suivant le protocole d'immunofluorescence (voir section 3.C.). Les anticorps primaires et secondaires utilisés pour cette immunofluorescence sont les mêmes que ceux décrits dans la section 3.C.

3.F. Traitements inhibiteurs des Cathepsines

Pour les expériences d'inhibition des cathepsines, les cellules les cellules HEK293-APP^{695wt} sont ensemencées à raison de 300000 cellules par puits puis transfectées au bout de 24H avec le vecteur vide pcDNA-Mock, le pcDNA-ADAM30^{wt} ou le vecteur pcDNA-ADAM30^{mut} puis exposées pendant 24H supplémentaires à la pepstatine A (10µM) (Sigma-Aldrich, Allemagne), à la leupeptine (20µM) (Sigma-Aldrich) ou à l'E64-D (10µM) (Sigma-Aldrich). Les métabolites de l'APP sont mesurés et quantifiés. Trois expériences indépendantes sont réalisées en duplicata et toutes

les mesures par ELISA sont effectuées deux fois pour chaque échantillon. Enfin, un test T bilatéral est effectué pour comparer les résultats.

3.G. Traitements inhibiteurs du lysosome et protéasome

Les cellules HEK293-APP^{695wt} sontensemencées à raison de 300000 cellules par puits puis transfectées au bout de 24H avec le vecteur vide pcDNA-Mock, le pcDNA-ADAM30^{wt} ou le vecteur pcDNA-ADAM30^{mut}. Vingt-quatre heures après transfections, les cellules sont traitées soit avec 100nM de Bafylomicine A pendant 16H (Sigma-Aldrich®, Allemagne), soit avec 1µM de Chloroquine pendant 16H (Sigma-Aldrich®, Allemagne) ou encore avec 1µM de Lactacystine pendant 5H (Calbiochem®, USA). Les métabolites de l'APP sont mesurés et quantifiés. Trois expériences indépendantes ont été réalisées en duplicat et toutes les mesures par ELISA ont été effectuées deux fois pour chaque échantillon. Enfin, un test T bilatéral a été effectué pour comparer les résultats.

3.H. Western Blots

Les lysats cellulaires sont dénaturés puis déposés sur un gel de polyacrylamide (Bis-Tris) 4-12% (Nu-PAGE Novex, Lifetechnologies). Après migration, les protéines sont électro-transférées sur membrane de nitrocellulose en utilisant le système Biorad Trans-Blot transfer system kit (Biorad, Hercules, CA, USA) selon les instructions du constructeur. Après vérification de la qualité du transfert grâce au rouge Ponceau, les membranes sont saturées dans du lait délipidé et dilué à 5% dans du TNT. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire. Les Westerns Blots sont alors incubés avec un anticorps secondaire couplé à une activité Horseradish-peroxydase (Jackson Immunoresearch laboratories, West Grove, PA, USA). La révélation est obtenue par chimioluminescence (luminata classico, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) à l'aide du Biorad Chemidoc XRS (Biorad). Toutes les expériences sont réalisées au moins en triplicata, et toutes les mesures sont faites deux fois pour chaque échantillon. Enfin, un test T bilatéral a été effectué pour comparer les résultats.

Protéine cible	Anticorps primaires
ADAM30^{wt/mut}	ADAM30 antibody [N1N2], N-term GTX117694, GeneTex, Irvine, Californie, USA (souris)
APP^{wt/mut}	Rb APPCter-C17 (lapin) Ms Beta Amyloid, 1-16 (6E10), Covance, Princetown, NJ, USA (souris)
CTSD	Ms [CTD-19] to Cathepsin D (ab6313), Abcam, Cambridge, RU (souris)
EEA1	Ms mAb to EEA1 [1G11] (ab70521), Abcam (souris)
Rab7	Ms mAb to RAB7 [Rab7 - 117] (ab50533), Abcam (souris)
LAMP2	Ms mAb to LAMP2 [H4B4] (ab2563), Abcam (souris)
IRS4^{wt/mut}	IRS4 antibody [EP907Y] (ab52622), Abcam (souris) (WB) IRS4 antibody (ab56477), Abcam (lapin) (IF,PLA)
Anticorps secondaire <i>life technologies, Waltham, Massachusetts</i>	

Alexa Fluor 633 goat anti-mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed A21052 (souris)

Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG (H+L) highly cross-adsorbed A21071 (lapin)

Alexa Fluor 405 goat anti-mouse IgG (H+L) A31553 (souris)

Alexa Fluor 405 goat anti-rabbit IgG (H+L) A31556 (lapin)

Tableau 5. Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot, en Immunofluorescence et en PLA. Tous les anticorps utilisés ont été obtenus auprès de fournisseurs.

3.I. Tests ELISAs

Les A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂, APPs- α et APPs- β sont quantifiés par ELISAs sandwich : les A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ sont mesurés grâce aux kits INNOTEST[®] β -amyloid (1-42) et β -amyloid (1-40) (Innogenetics, Gent, Belgique), et les APPs- α et APPs- β sont mesurés avec les kits IBL-International[®] (IBL-International[®], Allemagne). Les échantillons sont

déposés dans les puits de la plaque ELISA tapissés d'anticorps anti-A β 1-40, A β 1-42 ou APPs- α et incubés à 4°C sur la nuit (ELISA A β 1-40, APPs- α et APPs- β) ou 1 heure à température ambiante (ELISA A β 1-42). Après plusieurs rinçages de la plaque avec le tampon de lavage du kit (0,05% de Tween20 40 X dans un tampon phosphate), l'anticorps de détection couplé à une activité peroxydase est ajouté aux puits et le tout est incubé à 4°C pendant 1 heure (ELISA A β 1-40 et A β 1-42) ou 30 minutes (ELISA APPs- α et APPs- β). Cet anticorps reconnaît un épitope différent de celui des anticorps tapissant les puits. Après rinçage, le chromogène (substrat de la peroxydase) est ajouté et mis à incuber pendant 30 min à température ambiante. Enfin, la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout d'une solution STOP (1 N H₂SO₄). Les mesures de l'activité peroxydase sont réalisées par un spectromètre à une longueur d'onde de 450 nm.

3.J. Immunofluorescences et tests d'interaction entre protéines (Proximity Ligation Assays - PLAs)

Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont lavées au PBS puis fixées au paraformaldéhyde dilué à 4% dans le PBS pendant 20min à température ambiante. Ces cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide de Triton X-100 dilué à 0.25% dans du PBS. Après saturation avec 5% de BSA (bovine serum albumin), les cellules sont incubées toute la nuit avec les anticorps primaires à 4°C (voir section 3.A. pour les anticorps utilisés) dilués au 500^e dans du PBS avec 5% de BSA et 0.25% de Triton X-100. Après rinçage, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires dilués au 400^e (voir section 3.A. pour les anticorps utilisés). Les lames sont ensuite analysées sous un microscope confocal (LSM 710) localisé au niveau de la plateforme de microscopie MICPAL (Institut Pasteur de Lille).

Le protocole de départ du PLA est similaire à celui d'une immunofluorescence classique. Pour le PLA, la fixation dure 30min puis les cellules sont perméabilisées pendant 10min dans du Triton X-100 dilué à 0.25% dans du PBS. Après saturation dans une solution de BSA 1% (1% de BSA dans du PBS), les cellules sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans de la BSA 1% pendant 2 heures à température ambiante. L'anticorps primaire anti-CTSD (Abcam, référence ab6313-100) est dilué au 100^e et l'anticorps primaire anti-ADAM30 (Genetex, référence

GTX117694) au 50°. Après trois rinçages au PBS, le PLA est effectuée en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant les réactifs de leur kit (Olink Bioscience, Uppsala, Suède). La technique du PLA repose sur l'utilisation d'anticorps secondaires ciblant nos anticorps primaires utilisés de deux espèces différentes, couplés à des sondes nucléotidiques compatibles (une – et une +). Si deux protéines interagissent ou sont suffisamment proches, les sondes accrochées aux anticorps secondaires s'associent entre elles formant ainsi des doubles brins. Par réaction de PCR, ces sondes sont amplifiées une infinité de fois formant ainsi un long double brin d'ADN. L'ajout de sondes nucléotidiques couplées à un fluorophore déterminé (vert pour notre étude) va permettre la visualisation par microscopie à fluorescence de ces complexes par fixation de ces sondes sur les brins d'ADN néosynthétisés.

3.K. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques sont réalisées au moyen du logiciel de statistiques SAS (version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTATS

1. Caractérisation *ex vivo* de la modulation des dépôts amyloïdes par une sur-expression d'ADAM30

1.A. Caractérisation des lignées de souris utilisées

Afin d'étudier l'impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP *in vivo*, nous avons mis en place un modèle de souris triple transgéniques. Ces souris expriment d'une part un APP humain présentant deux mutations connues, la mutation suédoise en K⁶⁷⁰M et N⁶⁷¹L et la mutation Indiana en V⁷¹⁷F, et d'autre part un ADAM30^{wt} ou un ADAM30^{mut} humain dont l'expression conditionnelle est sous contrôle de l'expression du gène Cre. Ces souris présentent une expression de l'APP^{SweInd} spécifiquement au niveau du cerveau et principalement au niveau de l'hippocampe (Mucke et al. 2000). L'expression de Cre est localisée majoritairement au niveau de l'hippocampe mais aussi au niveau du Cortex et du Striatum (Burgin et al. 1990, Tsien et al. 1996). Si le gène d'ADAM30 humain est ubiquitaire dans nos souris grâce au locus Rosa26, son expression est inhibée par le codon stop localisé en amont du gène d'ADAM30 (Fig.28). De ce fait, seules les régions cérébrales présentant une expression du gène Cre permettent une recombinaison des deux sites LoxP supprimant le codon stop et donc permettant l'expression d'ADAM30 (Fig. 31). Pour vérifier l'expression des différents gènes surexprimés, nous avons caractérisé ces souris par RT-qPCR (Fig. 31). Le rôle des ADAMs dans différents métabolismes étant central et ADAM30 étant initialement identifiée au niveau des testicules, nous avons choisi un promoteur CamkIIα pour contrôler l'expression temporo-spatiale du gène Cre. Si CamkIIα permet une expression du gène Cre localisée au niveau de l'hippocampe et du cortex essentiellement, l'expression de CamkIIα ne débute que 14 jours après la naissance des souris, évitant ainsi les principales phases de développement critique des souris et n'intervenant pas dans la fertilité des mâles. Pour obtenir les souris triple transgéniques, nous avons procédé à des croisements de lignées de souris simple transgéniques. Nous avons alors travaillé sur des souris issues du croisement de souris APP^{SweInd}-CamKIIα/Cre (C57bl6J) et de souris ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} (C57Bl6N) utilisées uniquement en F1 à l'état hétérozygote. Ces souris que nous avons laissé vieillir 10mois sont dans un fond génétique mélangé C57BL6J/N (Fig.29).

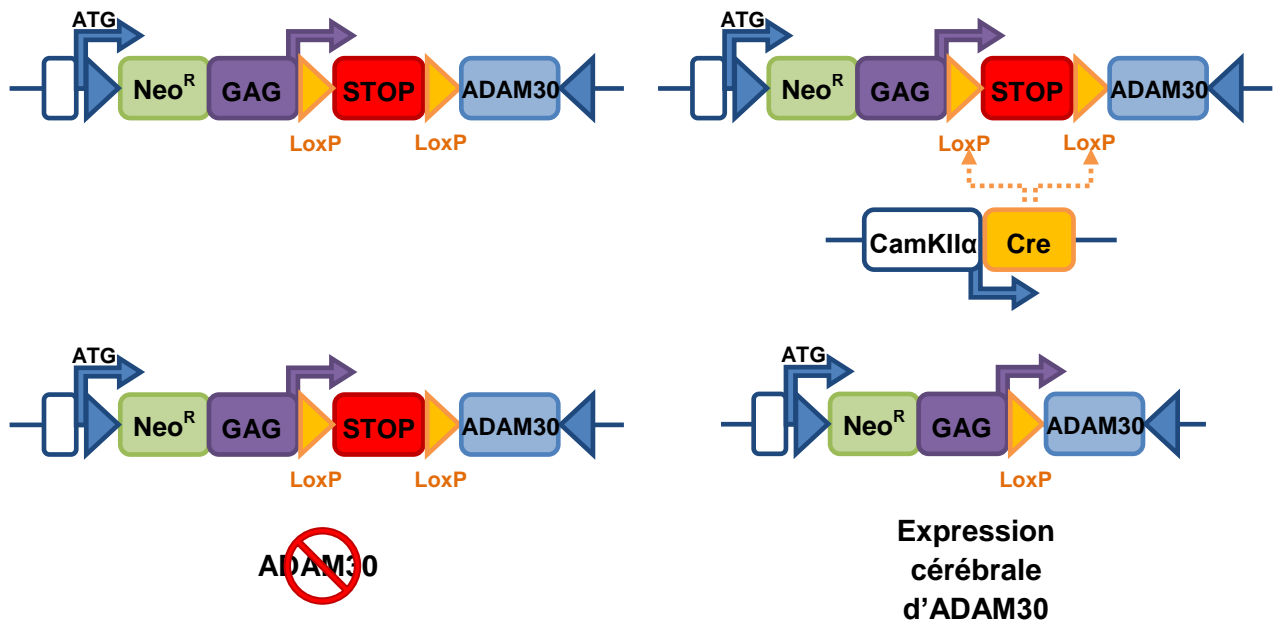


Figure 28. Schémas de la construction comportant le gène d'ADAM30 sous contrôle du système Crelox et du promoteur GAG. Les souris ne possédant que la contruction de gauche n'expriment pas ADAM30 du fait du codon stop en amont. En revanche à gauche, les souris ADAM30-CamKII α Cre possédant les deux constructions vont exprimer la cyclique recombinase Cre sous le contrôle du promoteur neuronal spécifique CamKII α , permettant ainsi une recombinaison des deux sites loxP entourant le codon stop. Ceci conduit à la délétion de ce codon stop et à l'expression du gène d'ADAM30 sous contrôle de son promoteur fort GAG.

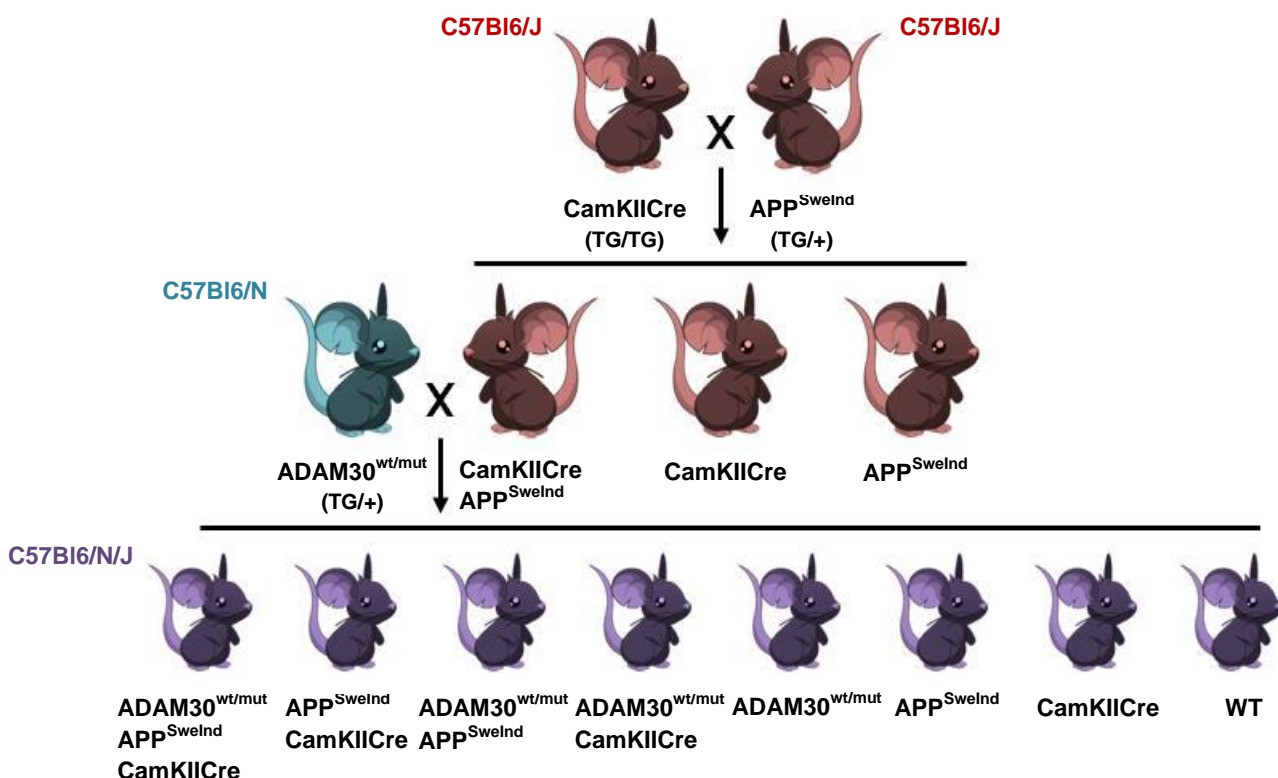
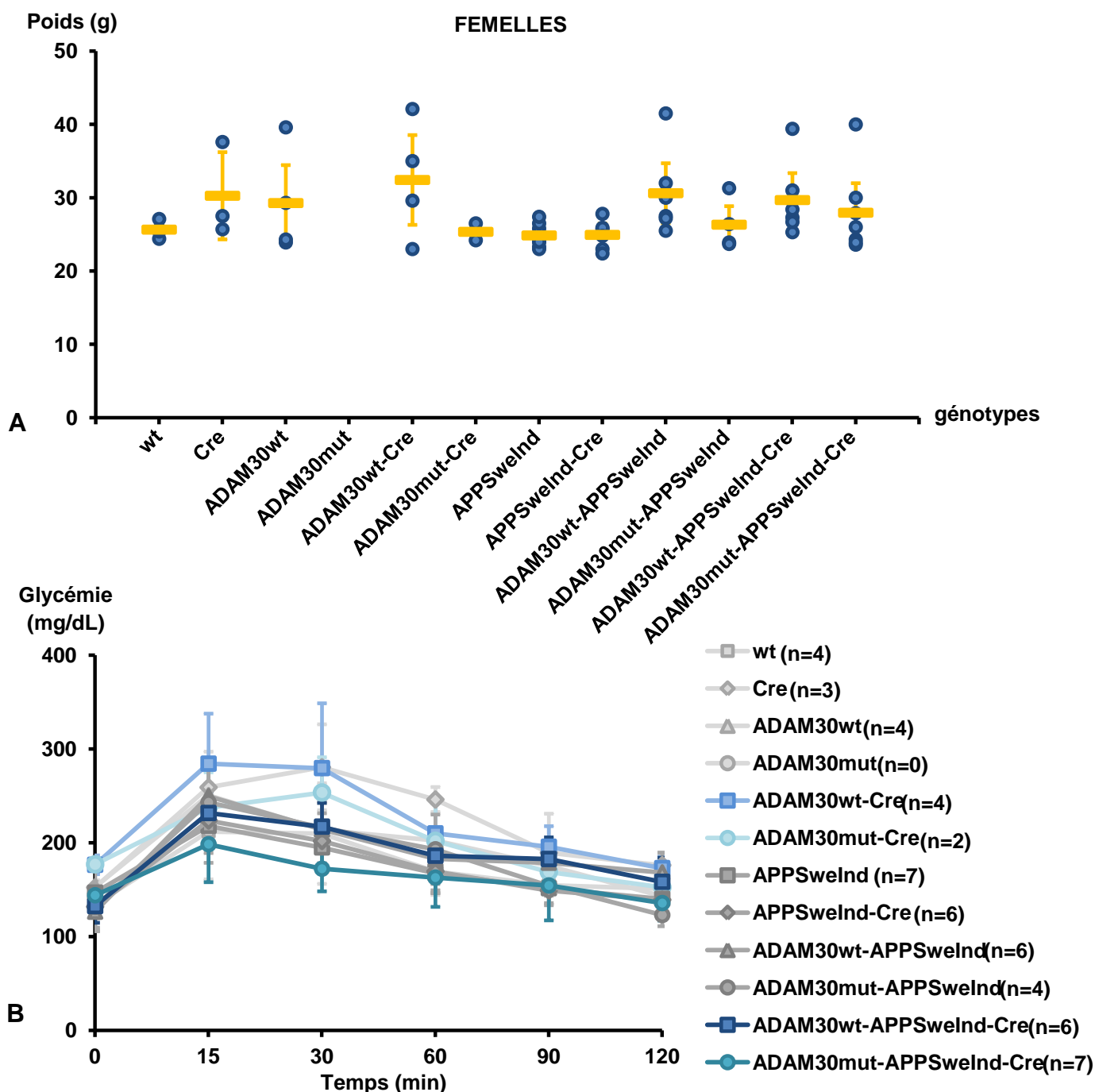


Figure 29. Représentation des différents croisements de lignées de souris effectués pour obtenir nos souris triple transgénique. En rouge, les lignées de souris dans le fond génétique C57Bl6/J, en bleu dans le fond génétique C57Bl6/N et en violet, les lignées de souris maintenues en F1 dans le fond génétique C57Bl6J/N. Ces dernières sont toutes à l'état hétérozygote.



A dix mois, les souris sont pesées et leur glycémie est mesurée (Fig.30). Aucune variation significative de poids entre nos différentes lignées de souris n'a été observée chez les femelles et les mâles (Fig.30.A et C). Nous avons réalisé des mesures de glycémie sur nos souris mises à jeun pendant 6 heures (Fig.30.B et D). Les mesures ont été réalisées à 0min (avant l'injection de glucose) puis à 15, 30, 60, 90 et 120min. Il semblerait que les lignées exprimant l'APP^{SweInd} présentent des glycémies plus basses que les animaux n'exprimant pas cet APP et cette observation est particulièrement visible chez les femelles. Notons que les souris exprimant ADAM30^{wt} semblent présenter à 15 et 30min une glycémie plus élevée que les souris exprimant ADAM30^{mut} et ceci chez les deux sexes (Fig.30.B et D).

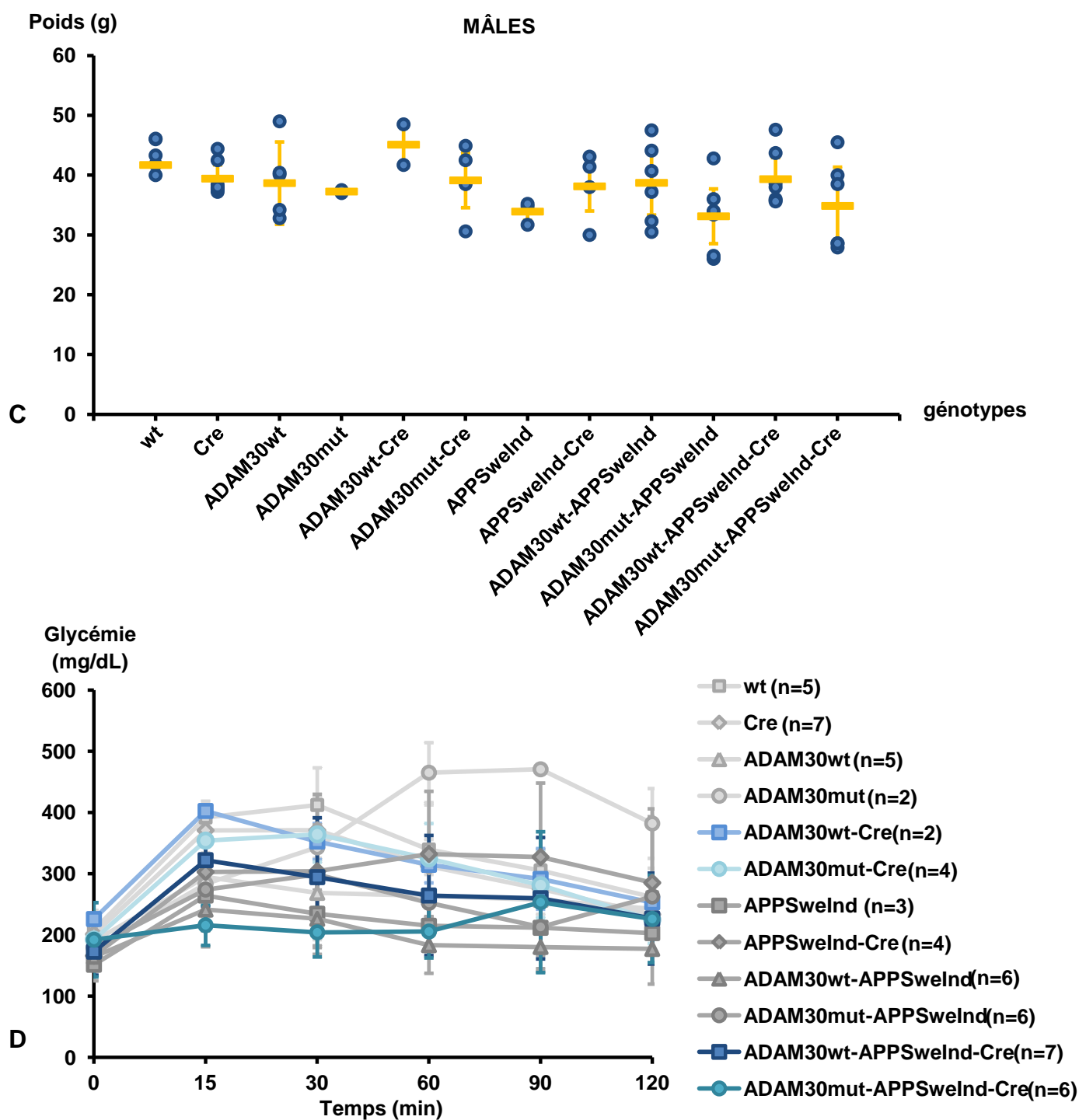


Figure 30. Mesure du poids et de la glycémie dans les différentes lignées de souris. A.(femelles) et C.(mâles) Mesure du poids des animaux à 10 mois en fonction de leur génotype. Chaque point correspond au poids d'une souris. Les barres jaunes correspondent à la moyenne de poids de chaque lignée. B.(femelles) et D.(mâles) Mesure de la glycémie à 10 mois des différentes lignées de souris après 6h de jeûne, à 0min (avant injection) puis à 15, 30, 60, 90 et 120min après injection intrapéritonéale de glucose. La mesure de la glycémie a été réalisée à la queue à différents temps comme indiqué grâce à un glucomètre à bandelettes. Tests statistiques: test student

Après sacrifice, les cerveaux des souris sont extraits et disséqués pour séparer et récupérer l'hippocampe et le cortex. Nous avons utilisé le cortex pour extraire l'ARN et réaliser des RT-qPCRs. Ces RT-PCRs permettent de caractériser chaque lignée en vérifiant le niveau d'expression des différents gènes d'intérêt (APP^{SweInd}, Cre, ADAM30^{wt}, ADAM30^{mut}) (Fig.31). Pour pouvoir comparer le niveau d'expression de chaque gène analysé, il est nécessaire de quantifier un gène rapporteur ou gène de ménage dont l'expression ne doit pas varier quelque soit les conditions ou le génotype des lignées. C'est pourquoi nous avons choisi initialement de quantifier l'expression de la GAPDH comme gène rapporteur. Cependant une variabilité a été constatée, indépendante d'un génotype en particulier mais potentiellement due au mélange des fonds génétiques C57BL6J et C57BL6N survenant lors du croisement pour obtenir les souris triple transgéniques. Nous avons donc testé et choisi un autre gène rapporteur, NeuN dont l'expression est stable quelque soit le génotype des lignées.

Comme attendu, ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} ne sont exprimées que chez les souris exprimant le gène Cre (ADAM30^{wt/mut}-CamKIIα/Cre, ADAM30^{wt/mut}-APP^{SweInd}-CamKIIα/Cre) les autres souris possédant le gène d'ADAM30 ne l'expriment pas du fait de l'absence du gène Cre chez ces souris et donc de l'expression du codon STOP avant le gène d'ADAM30 (Fig.28 et 31). Nous avons pu constater que le niveau d'expression de l'APP^{SweInd} est le même quelque soit la lignée de souris considérée. ADAM30 ne semble donc pas moduler l'expression de l'APP *in vivo*. Le niveau d'expression de l'APP semble légèrement diminuer en fonction du nombre de gènes d'intérêts portés par les lignées (Fig.31). L'expression de la Cre et d'ADAM30 (nécessairement) semble légèrement augmenter en fonction du nombre de gènes d'intérêt portés par les lignées. Ainsi Cre et ADAM30 ont une expression plus élevée chez les souris triple transgéniques que chez les souris double transgéniques (Fig.31). Ces variations pourraient provenir du mélange de fond génétique, du nombre de gènes surexprimés ou du nombre de copies de ces gènes en fonction des croisements successifs effectués.

Puisqu'ADAM30 ne semble pas moduler l'expression de l'APP nous avons voulu aussi déterminer si ADAM30 modulait l'expression des sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP en regardant le niveau d'expression de BACE1 (une des deux β-sécrétases) (Fig.32).

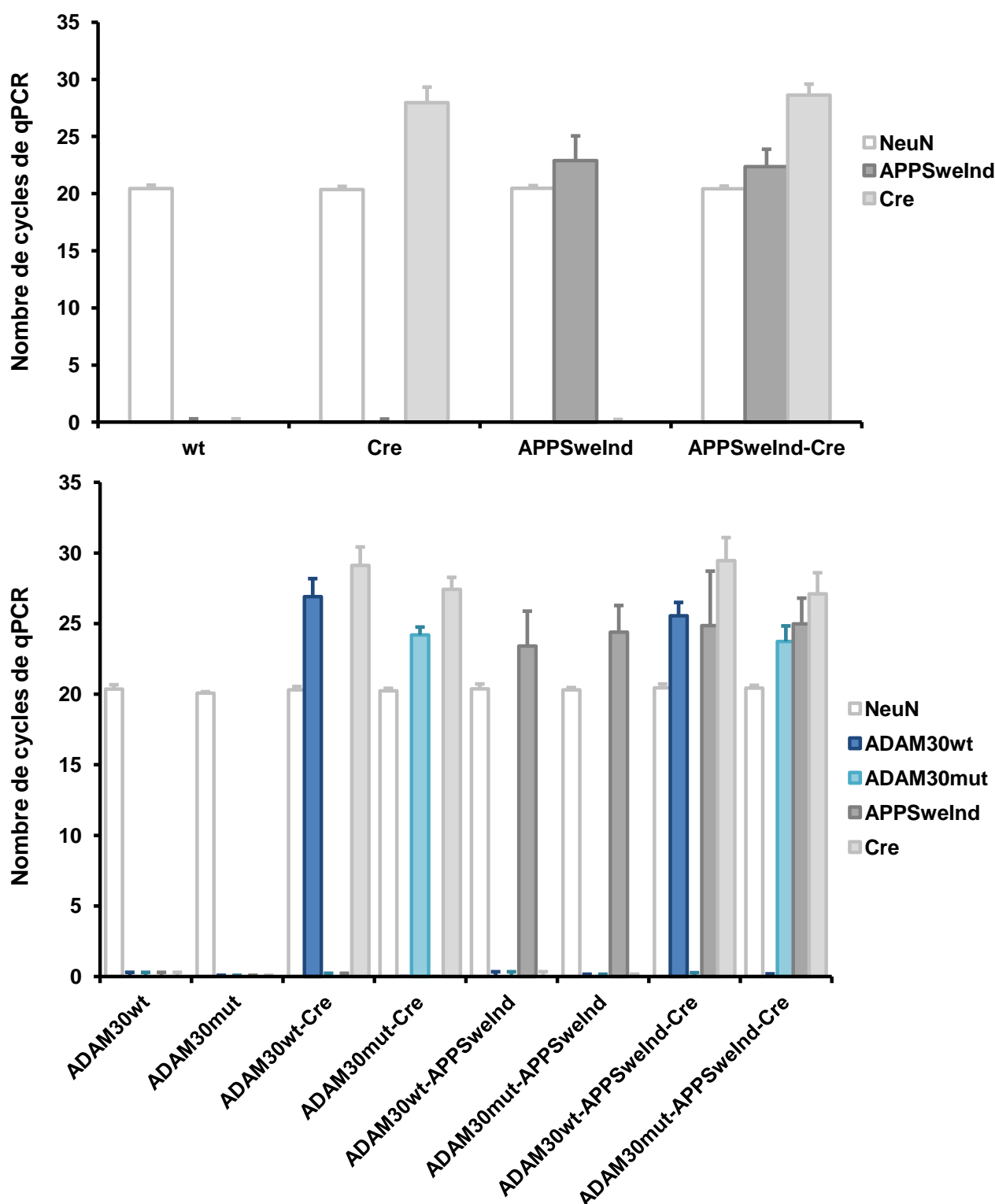


Figure 31. Analyses par RT-qPCR des différents génotypes de nos lignées de souris sur-exprimant ou non ADAM30^{wt/mut} après 10 mois de vieillissement. Notons que seules les lignées de souris possédant à la fois le transgène ADAM30 et le transgène Cre, vont avoir une expression d'ADAM30 qu'il soit sauvage ou muté ici en bleu foncé et en bleu clair. Le gène NeuN neuronal est utilisé comme gène de référence endogène pour le niveau d'expression des transgènes. Tests statistiques: test student

Comme attendu, nous avons pu constater que les groupes exprimant de l'APP présentent une expression de BACE1 plus élevées par rapport aux lignées de souris n'exprimant pas d'APP. Cependant, les lignées de souris exprimant ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} ne présentent pas de variation du niveau d'expression de BACE1 par rapport aux lignées n'exprimant pas ADAM30 (Fig.32).

1.B. Quantification des dépôts amyloïdes

Pour mieux comprendre et évaluer l'impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP et la sécrétion du peptide amyloïde, nous avons décidé de quantifier les A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ à partir des extraits obtenus des hippocampes des différentes lignées de souris issues de la génération F1 du croisement des souris APP^{SweInd}-CamKII α /Cre et de souris ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} (Fig.29).

Par ELISA, nous avons pu observer que les lignées de souris exprimant ADAM30^{wt} (ADAM30^{wt}-CamKII α /Cre, ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre) présentent une quantité d'A β ₁₋₄₂ soluble hippocampique significativement inférieure à celle des lignées de souris exprimant seulement l'APP^{SweInd} (Fig.33). Par exemple, les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre ont un niveau d'A β ₁₋₄₂ hippocampique 39% plus bas que les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd} (p=0,009). De plus, les souris exprimant un ADAM30^{mut} (ADAM30^{mut}-CamKII α /Cre, ADAM30^{mut}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre) ont une quantité d'A β ₁₋₄₂ soluble équivalente à celle des souris n'exprimant que l'APP^{SweInd}. Nous avons également pu constater que la concentration hippocampique d'A β ₁₋₄₂ soluble est inversement corrélée au niveau d'expression d'ADAM30^{wt}. Par exemple, les souris triple transgéniques ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre présentant un niveau d'expression d'ADAM30^{wt} élevé ont une quantité d'A β ₁₋₄₂ plus faible que les souris triple transgéniques ayant un niveau d'expression d'ADAM30^{wt} bas.

Le modèle de souris APP^{SweInd} est connu pour présenter une faible production d'A β ₁₋₄₀, c'est pourquoi nous avons choisi une méthode de détection plus sensible que l'ELISA. Ainsi par Alpha Lisa, parmi les souris présentant un niveau d'A β ₁₋₄₀ suffisamment élevé pour pouvoir être détecté et analysé (ne représentant que la

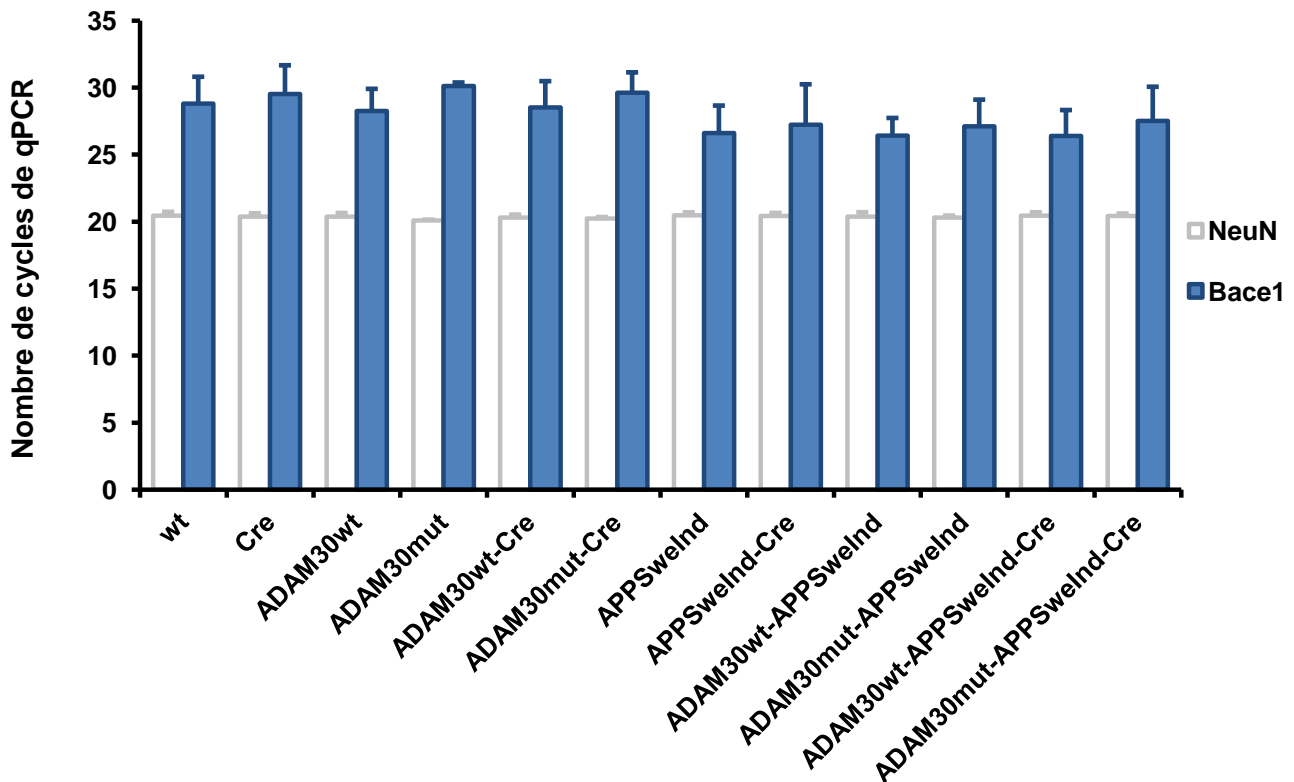


Figure 32. Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression de BACE1 dans nos lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut}. Plus le nombre de cycle de qPCR est élevé, moins l'expression du gène est forte. Le gène NeuN neuronal est utilisé comme gène de référence endogène pour le niveau d'expression des transgènes. Aucune différence significative n'a pu être observée en utilisant un test de student.

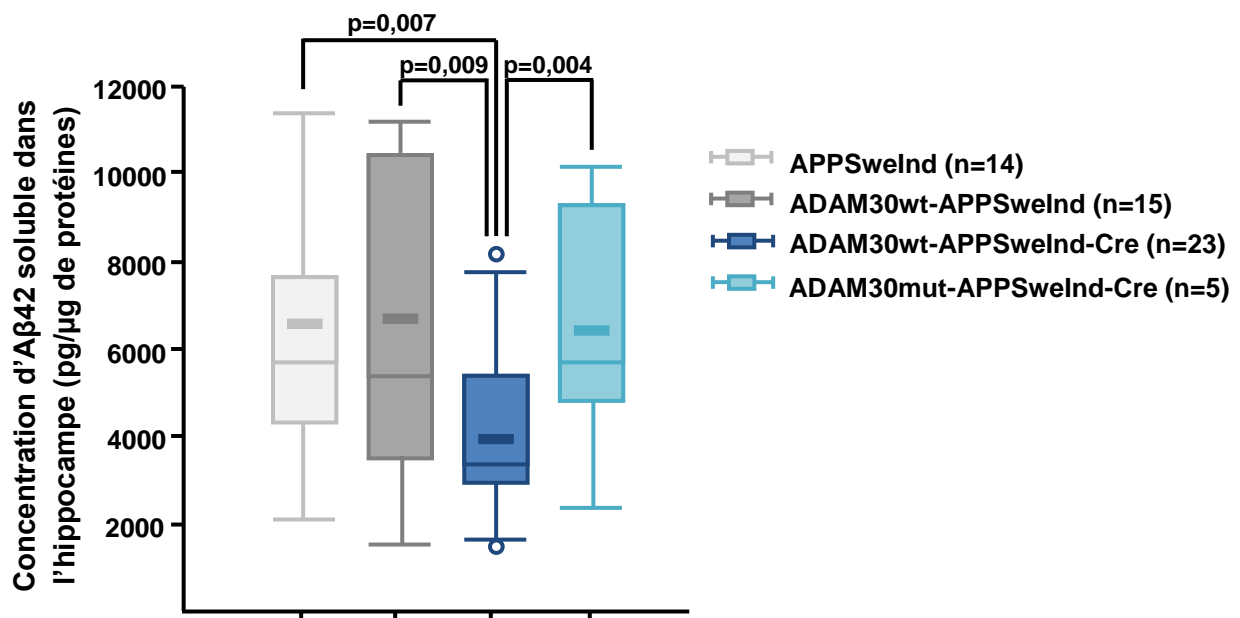


Figure 33. Variations de la concentration en Aβ42 dans l'hippocampe de différentes lignées de souris transgéniques exprimant ou non ADAM30^{wt/mut}. Mesures effectuées par tests ELISA avec l'anticorps 6E10. Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les différentes lignées de souris. Ligne fine centrale: moyenne. Lignes fines hautes et basses: premier et troisièmes quartiles. Cercles: individus ayant des valeurs extrêmes. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

moitié des animaux disponibles), nous avons pu observer un niveau d'A β ₁₋₄₀ hippocampique plus faible chez les souris exprimant ADAM30^{wt} par rapport aux souris n'exprimant pas ADAM30 (953 \pm 713 pour les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre contre 1904 \pm 554 pour les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd} (p=0,02) et 1597 \pm 887 pour les souris APP^{SweInd} (p=0,10).

1.C. Cartographie 3D des dépôts amyloïdes

En collaboration avec le laboratoire CEA, I2BM du MIRCen, nous avons choisi d'utiliser l'histologie 3D à haut débit pour détecter et mesurer les dépôts amyloïdes au niveau du cerveau des différentes lignées de souris (Fig.34). A partir des coupes de cerveaux et des immunohistochimies réalisées par la société Neuroscience Associates, le laboratoire CEA, I2BM du MIRCen a pu générer des images de cerveaux de souris en volume et projeter la répartition des dépôts amyloïdes au sein de ces volumes. L'histologie 3D a l'avantage (par rapport à l'histologie commune ou 2D) de mettre en lumière non seulement les dépôts amyloïdes présents sur une coupe de cerveau de souris, mais également un volume complet des dépôts amyloïdes dans le cerveau des souris. Cet outil puissant permet donc de mieux représenter les variations de la quantité de dépôts en fonction de la zone cérébrale et de la lignée de souris étudiée (Fig.34).

Grâce à l'histologie 3D, nous avons pu constater que, dans le pro-encéphale des souris triple transgéniques ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre, le volume occupé par les dépôts amyloïdes est significativement inférieur de 20% (p=0,03) à celui observé chez les souris double transgéniques ADAM30^{wt}-APP^{SweInd} (Fig.35). Cette différence est encore plus marquée lorsque l'on cible l'hippocampe où cette fois ci, le volume occupé par les dépôts amyloïdes chez les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre est significativement inférieur de 28% (p=0,01) par rapport à celui observé chez les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd} (Fig.35). Ces résultats confortent donc l'hypothèse qu'ADAM30 semble responsable d'une diminution du niveau de peptides amyloïdes et plus précisément d'A β ₁₋₄₂ au niveau de l'hippocampe et font écho aux résultats obtenus en modèles cellulaires.

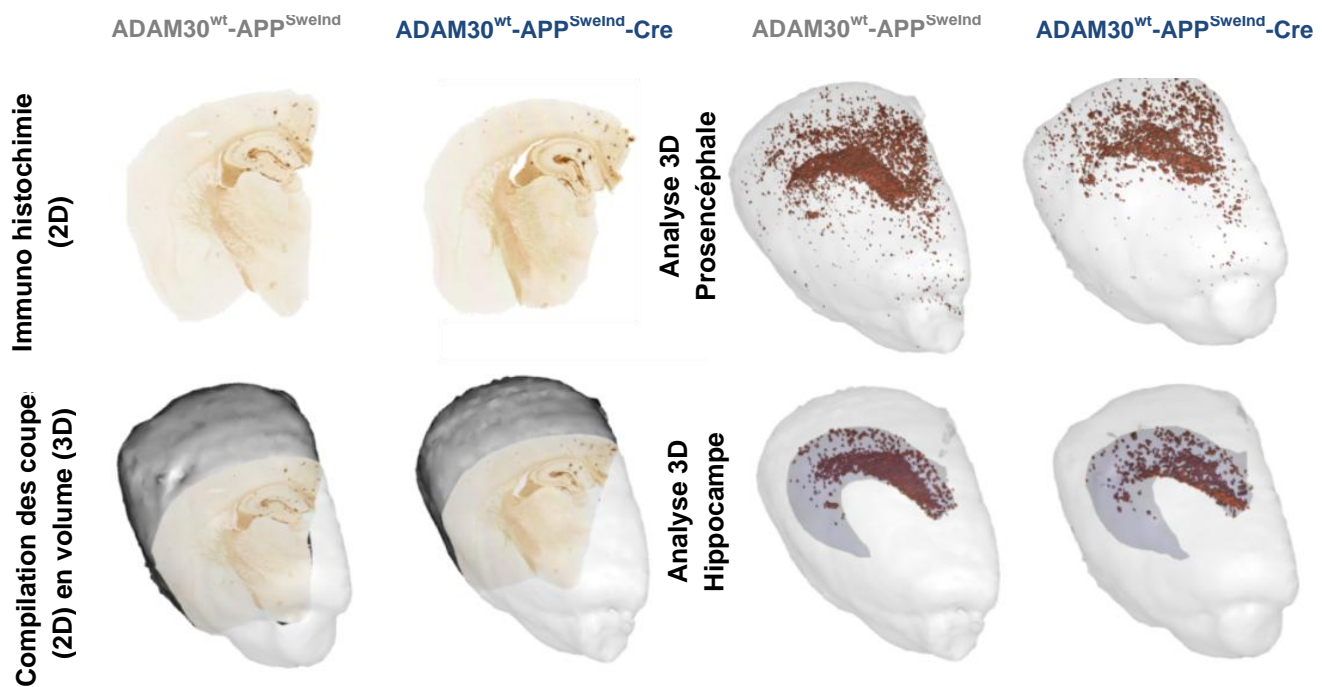


Figure 34. Reconstructions tridimensionnelles des cerveaux de souris sur-exprimant ADAM30^{wt/mut} et analyses des dépôts amyloïdes. Images obtenues après compilations des immunohistochimies réalisées avec l'anticorps 6E10 à gauche ou des analyses numériques des dépôts amyloïdes issues de ces immunohistochimies à droite.

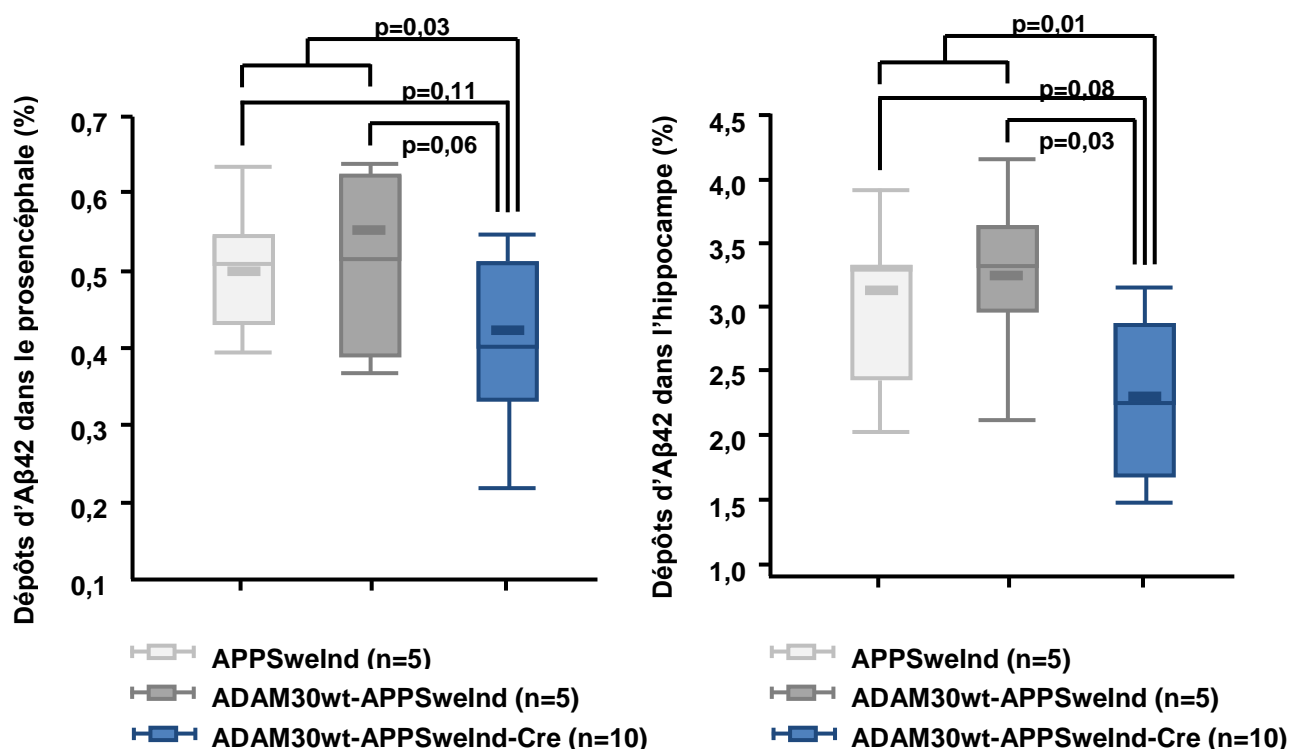


Figure 35. Quantification des dépôts amyloïdes à partir des analyses 3D précédentes dans le prosencéphale et l'hippocampe des souris sur-exprimant ou non ADAM30^{wt/mut}. Quantification réalisée à l'aide d'un logiciel d'analyse sur les volumes de la figure 34. Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les différentes lignées de souris. Ligne fine centrale: moyenne. Lignes fines hautes et basses: premier et troisièmes quartiles. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

2. Recherche des substrats d'ADAM30

2.A. ADAM30 ne module pas directement les sécrétases du métabolisme de l'APP

D'après les précédents résultats obtenus dans nos deux modèles cellulaires, nous avons pu constater que la sur-expression d'ADAM30^{wt} entraîne une diminution de production de tous les produits du métabolisme de l'APP sans pour autant diminuer la production ni la quantité d'APP mature (holo-APP). Dans un premier temps, nous avons collaboré avec le laboratoire UMR 7275 CNRS de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de Nice, pour déterminer si l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP pouvait passer par la modulation de l'activité des sécrétases ce qui impacterait indirectement les voies amyloïdogène et non-amyloïdogène. Leurs travaux ont montré qu'ADAM30 ne module pas l'activité de la β et γ -sécrétase (Fig.36.A et B).

Bien que nous ayons montré précédemment qu'ADAM30 n'était pas localisé au niveau de la membrane cellulaire, nous avons alors supposé qu'ADAM30 pourrait directement faciliter la dégradation de l'APP avant son entrée dans les voies amyloïdogène et non-amyloïdogène à la surface de la cellule. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'internalisation de l'APP après sur-expression d'ADAM30^{wt} ou d'un vecteur vide dans les cellules HEK293-APP^{695wt} (Fig.37). Nous avons pu constater que l'internalisation de l'APP ne varie pas quelque soit les conditions étudiées : sans incubation des cellules à 37°C, avec incubation des cellules à 37°C de 5 à 30min, en présence d'ADAM30^{wt} ou non (Fig.37). ADAM30 ne semblerait donc pas dégrader directement l'APP et ne modulerait pas le métabolisme de l'APP en agissant sur les sécrétases.

Nous avons donc supposé qu'ADAM30 pouvait moduler le métabolisme de l'APP de manière indirecte grâce à un substrat non déterminé.

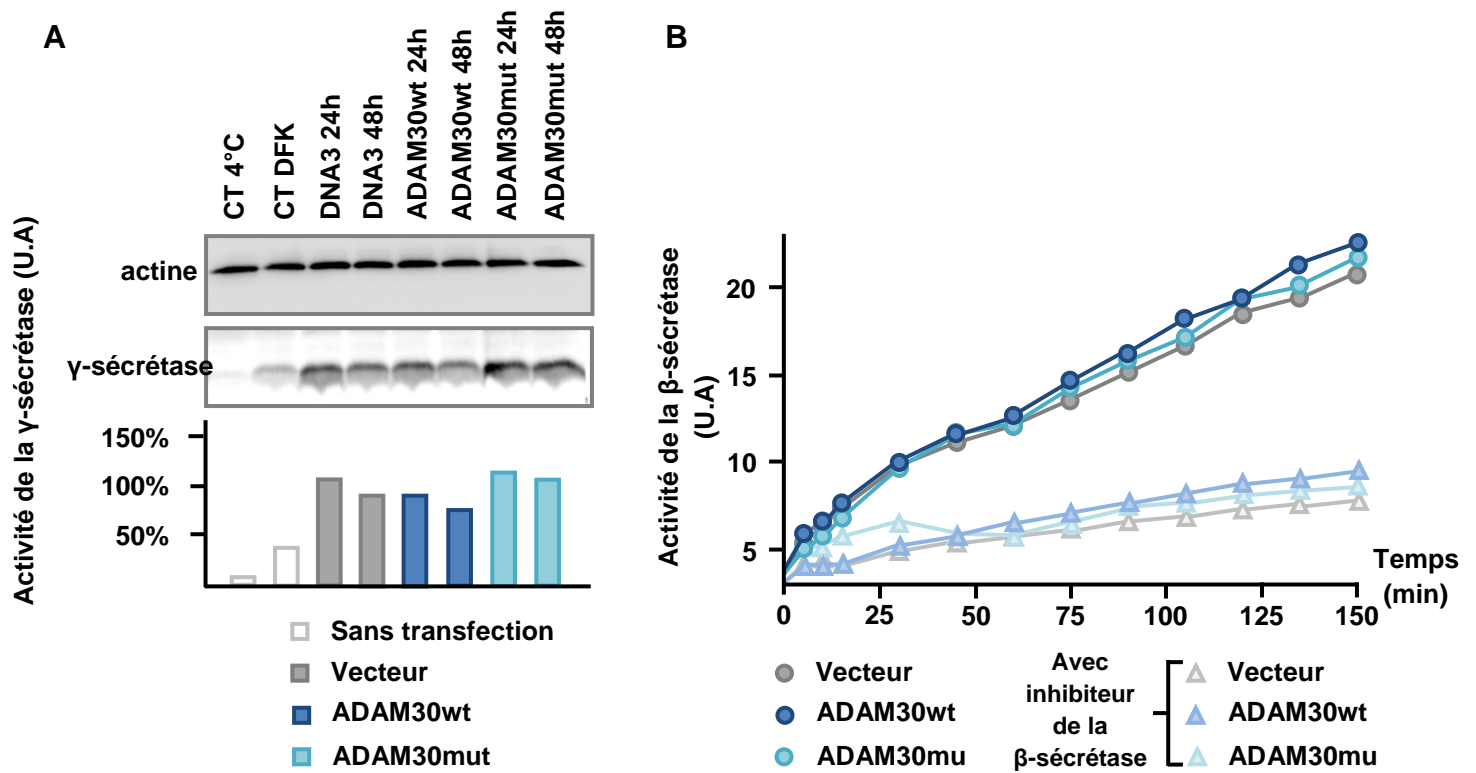


Figure 36. Mesure de l'activité de la γ (A) et β (B) sécrétase en présence ou non d'une sur-expression d'ADAM30^{wt/mut}. L'activité de la β -sécrétase (mesure de l'intensité de fluorescence émise par son substrat) est mesurée en présence (traits clairs) ou non (traits foncés) d'un traitement inhibiteur de cette sécrétase.

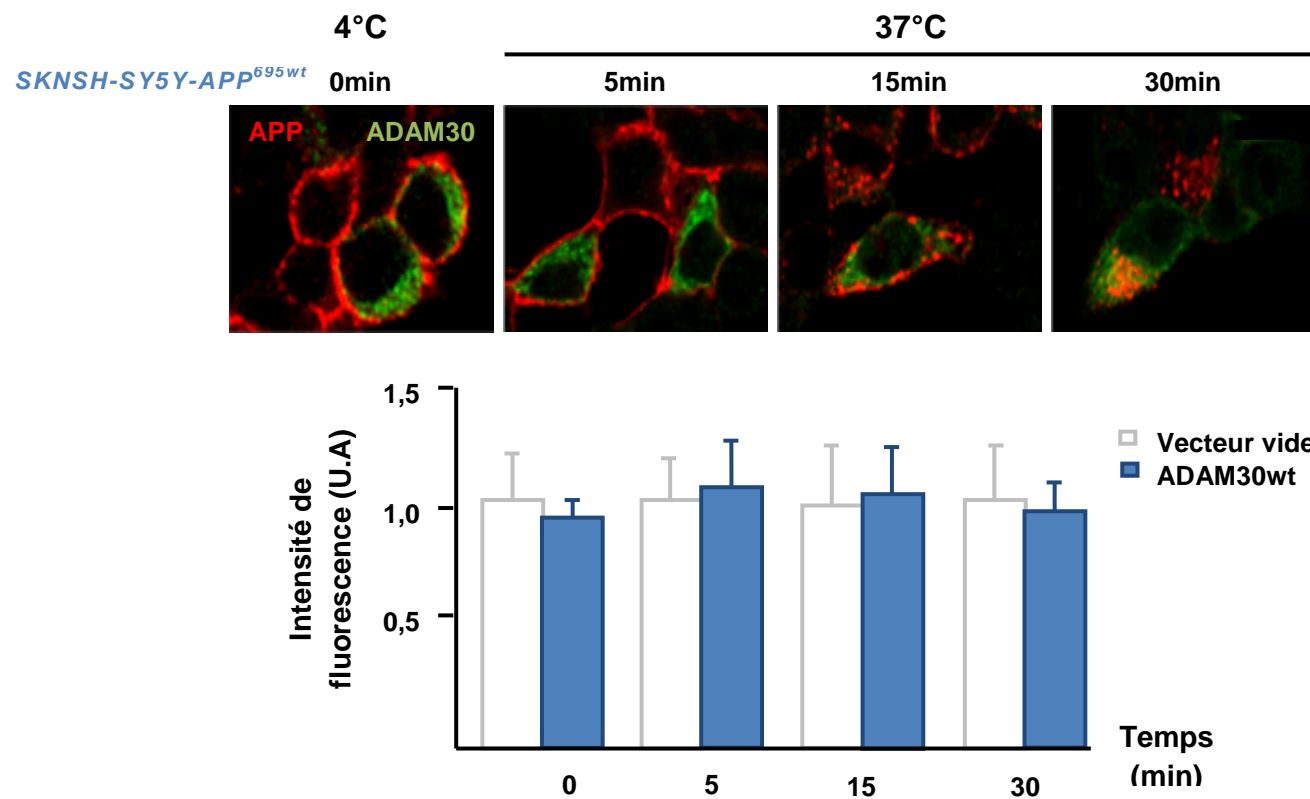


Figure 37. Observation par immunofluorescence de l'impact d'ADAM30 sur l'internalisation de l'APP dans les cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt}. Observations et quantifications réalisées sur cellules mises à 4°C permettant de stopper les mécanismes d'internalisation, puis progressivement remises à 37°C (de 5 à 30 min). Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

2.B. Recherche des substrats d'ADAM30 : COFRADIC-SILAC

A ce jour, aucun des substrats d'ADAM30 n'est connu. Nous avons choisi une approche différentielle systématique afin de mettre en évidence les substrats d'ADAM30. Cette méthode effectuée en collaboration avec les départements de Biochimie et de Recherche médicale sur les protéines du VIB de Ghent, est un ensemble de deux techniques différentes : le SILAC (SILAC-labeled N-terminones) permettant de marquer toutes les protéines néo-synthétisées de deux lignées cellulaires cultivées en parallèle dans des milieux enrichis en arginine marquée (marquage froid au carbone ^{12}C ou ^{13}C), et le COFRADIC (N-terminal Combined Fractional Diagonal Chromatography) permettant d'analyser le spectre peptidique de deux extraits de lignées cellulaires mélangés après acétylation des protéines en N-terminal (Fig.27). Contrairement aux techniques classiques d'analyse du spectre peptidique, cette technique nous a permis de comparer directement et simultanément le profil peptidique de nos deux lignées cellulaires HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} et HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{mut}. Puisque la seule différence entre nos deux lignées est l'expression d'ADAM30^{wt} ou d'ADAM30^{mut}, les peptides obtenus par ces techniques doivent correspondre aux protéines clivées par ADAM30 et donc doivent être absents de l'échantillon provenant des cellules exprimant un ADAM30^{mut}. Ainsi, sur les 2238 protéines que nous avons pu obtenir par COFRADIC, seules 18 protéines caractérisées par 25 peptides différents ont été retenues (Tab.6). Cette sélection a été effectuée en tenant compte du ratio $^{12}\text{C}:^{13}\text{C}$ des néo-peptides N-terminaux marqués par SILAC. Ces 18 protéines sont donc des substrats potentiels d'ADAM30. La majorité de ces protéines sont des histones ou des protéines ribosomales impliquées dans les mécanismes de transcription et de translation. Nous nous sommes intéressés à deux protéines présentes dans cette liste : la CTSD (Cathepsine D) et l'IRS4 (Insuline Receptor Substrate 4) (Tab.6).

Protéine contenant le peptide	ratio ¹³ C/ ¹² C	numéro d'accès Uniprot	Séquence du peptide
Insulin receptor substrate 4 (IRS-4)	0,29	O14654	SGGGKSGSGKSGDGDGER
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	0,36	O00571	SSDNQSGGSTASKGR
60S ribosomal protein L19	0,55	P84098	KKLLADQAEAR
40S ribosomal protein S30	0,58	P62861	KKKKKTGR
Histone H1.1	0,61	Q02539	AKAVKPAAKAR
Histone H1.3 (Histone H1c)	0,61	P16402	AKKAGATAGKR
40S ribosomal protein S30	0,62	P62861	KKKKKTGR
Cathepsin D (CTSD)	0,65	P07339	ALGGVKVER
60S ribosomal protein L31	0,67	P62899	PAKKGGEKKKGR
60S ribosomal protein L31	0,68	P62899	SAINEVVTR
Signal recognition particle 14 kDa protein (SRP14)	0,68	P37108	MVLLESEQFLTELTR
60S ribosomal protein L31	0,69	P62899	AKKGGEKKKGR
Histone H1.1	0,69	Q02539	AVKPAAKAR
39S ribosomal protein L4, mitochondrial	0,69	Q9BYD3	LSSLAEAAAR
60S ribosomal protein L15	0,69	P61313	KKQSDVMR
Nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B)	0,69	P22392	LVAMKFLR
60S ribosomal protein L21	0,70	P46778	TNTKGKR
60S ribosomal protein L35	0,70	P42766	AKIKAR
G kinase-anchoring protein 1	0,70	Q5VSY0	ASAVLSSVPTTASR
60S ribosomal protein L31	0,70	P62899	APAKKGGEKKKGR
60S ribosomal protein L30	0,70	P62888	VAAKKTCKSLESINSR
60S ribosomal protein L18a	0,70	Q02543	MKASGTLR
60S ribosomal protein	0,70	P36578	SGQGAFGNMCR
Protein DEK	0,70	P35659	SGVNSELVKR
40S ribosomal protein S3a (Fte-1)	0,71	P61247	AVGKNKR

Tableau 6. Liste des protéines obtenue par la méthode COFRADIC-SILAC présentant une sur-représentation d'un de leur peptide dans les cellules HEK293-ADAM30^{wt} comparé aux cellules HEK293-ADAM30^{mut}. La plupart de ces substrats appartiennent à la famille des Histones ou des protéines ribosomales. Ils constituent un biais classique lié à cette méthode et sont potentiellement issus d'un différentiel de croissance et de synchronisation des deux lignées. Ils n'ont donc pas été retenus pour la suite de l'analyse. La liste des 18 substrats a été obtenue après analyse statistique des 2238 peptides issus de la technique COFRADIC-SILAC, en suivant la courbe de distribution de Huber (voir Fig.27.B.)

2.C. Deux substrats potentiels d'ADAM30 d'intérêt : CTSD et IRS4

IRS4 est une phosphotyrosine de 160kDa faisant partie de la famille des substrats du récepteur à l'insuline (Fig.38). Cette famille contient actuellement 6 membres connus (IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, IRS5 ou DOK4 et IRS6 ou DOK5) bien que les mieux caractérisées soient IRS1 et IRS2. Toutes les IRS ont en commun d'être phosphorylées et activées par une tyrosine kinase, le récepteur à l'insuline. En plus d'un domaine N-terminal PH-PTB (Pleckstrin Homology-Phosphotyrosine Binding domain), ces protéines transductrices du signal insulinémique possèdent des séquences hautement conservées au cours de l'évolution en C-terminal leur permettant d'interagir et d'activer d'autres protéines en aval de la voie de signalisation (Fig.38). On retrouve ainsi (1) un motif YXXM (présent 6 fois chez IRS4) qui permet la liaison au domaine SH2 de la protéine PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), (2) un motif YXNX spécifique de la liaison au domaine SHS de la protéine Grb2, et enfin (3) un motif spécifique de liaison au domaine SH2 de la tyrosine phosphatase SHP-2 et de la phospholipase C γ (Fig.38) (Lavan *et al.* 1997, Fantin *et al.* 1999, Uchida *et al.* 2000, Cai *et al.* 2003). Enfin, si IRS1 et IRS2 sont largement exprimées dans la quasi totalité des tissus humains, l'expression d'IRS4 est retrouvée principalement dans le cerveau (hypothalamus), le rein, le foie... mais de manière beaucoup plus faible (Fantin *et al.* 1999).

La CTSD est une aspartyl-protéase de 45kDa localisée au niveau de la voie endosome/lysosome et dont l'activité dépend de deux choses : un pH acide (celui des lysosomes) et une endocatalyse activatrice (par autocatalyse ou par d'autres cystéines-protéases). En effet, la CTSD mature est composée de deux chaînes, une légère de 14kDa et une lourde de 31kDa, mais est inactive après sa production (pré-pro-CTSD) (Fig.39) (Fusek *et al.* 1992). Après coupure de son prodomaine au niveau du RE (pro-CTSD), la CTSD subie différentes modifications post-traductionnelles (glycosylations) puis est dirigée au niveau du lysosome où son domaine d'activation est clivé (CTSD mature). Enfin elle nécessite un clivage sur un site spécifique d'endoprotéolyse permettant ainsi la libération de ces deux chaînes qui se dimérisent et forment la CTSD mature active (Fig.39) (Fusek *et al.* 2005). Cette activation séquentielle serait nécessaire pour deux situations : (1) empêcher une activation trop précoce de

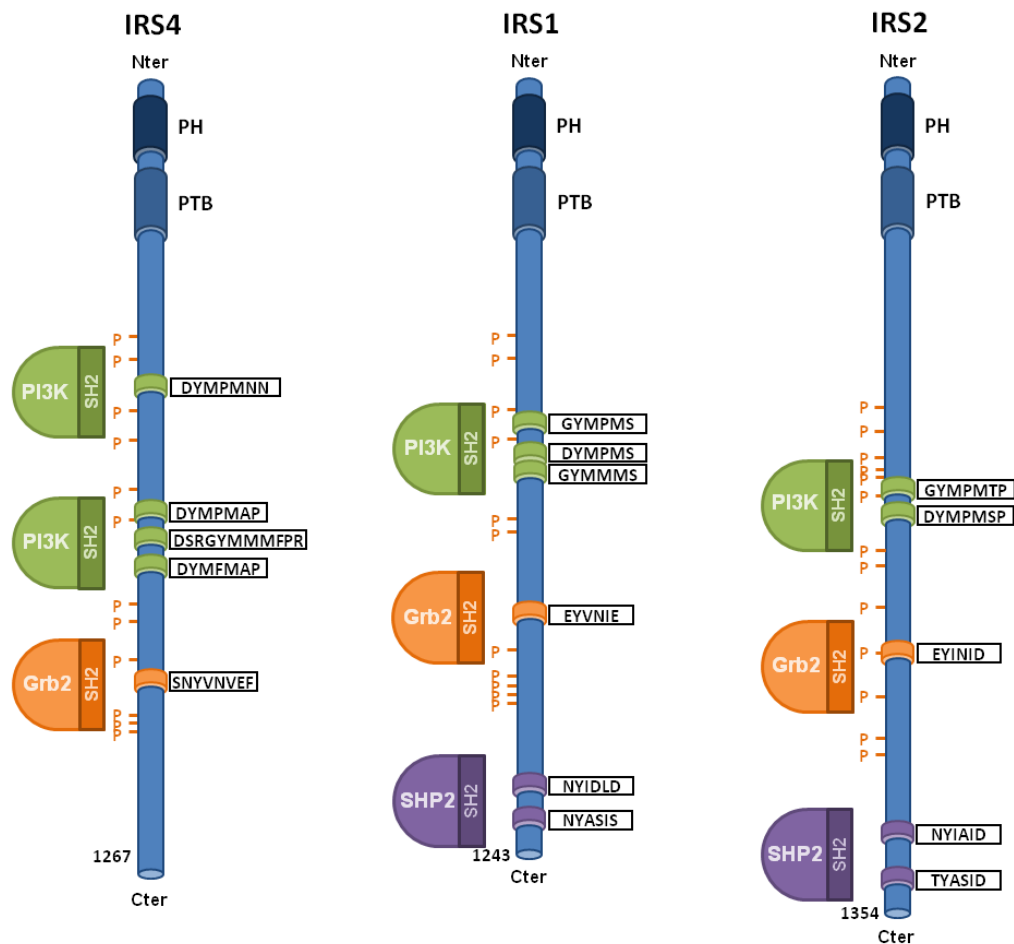


Figure 38. Représentation schématique des protéines de la famille des IRS dont IRS4, ainsi que les protéines de liaison (PI3K, Grb2 et SHP2) permettant la transduction du signal passant par ces IRS.

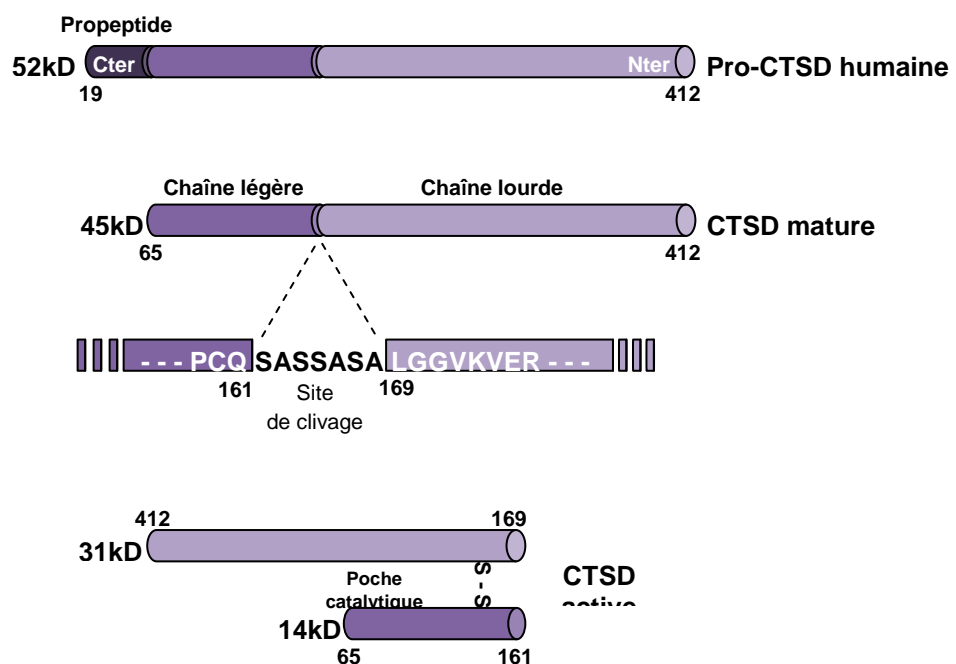


Figure 39. Représentation schématique de la CTSD et de son activation séquentielle. La CTSD nécessite une autocatalyse au niveau de son site activateur pour libérer ses deux chaînes. Les deux chaînes vont alors se dimériser grâce à un pont disulfure formant ainsi la CTSD activée.

la CTSD qui conduirait à une dégradation non régulée des protéines des voies de sécrétions, et (2) limiter la dégradation de la CTSD elle-même lors de son transit vers le lysosome. L'activité de la CTSD est portée par deux résidus aspartates en position 32 et 231 (Fig.39) (Fusek *et al.* 2005).

De façon intéressante, nous avons pu observer que le site théorique de coupure d'ADAM30 sur la CTSD, obtenu par la méthode COFRADIC-SILAC, correspond au site d'endoprotéolyse nécessaire à l'activation de la CTSD (Fig.40). Ainsi, bien qu'IRS4 soit la protéine en tête de liste des substrats potentiels d'ADAM30, nous avons étudié en priorité la caractérisation de la relation potentielle entre ADAM30 et la CTSD. En effet, contrairement à IRS4 qui ne possède pas de lien direct avec le métabolisme de l'APP, il a été montré que la CTSD participe à la dégradation et donc à la clairance de l'APP au sein du lysosome. De plus, certaines études montrent que la Cathepsine D participerait au métabolisme de l'APP en clivant celui-ci permettant ainsi la libération du peptide amyloïde (Sadik *et al.* 1999, Nixon *et al.* 2000). Aussi, bien qu'il ait été proposé que cette Cathepsine puisse être une nouvelle β -sécrétase ou γ -sécrétase de l'APP (Evin *et al.* 1999, Grüninger-Leitch *et al.* 2000), il semblerait que la CTSD participe au métabolisme de l'APP sans faire partie de ses sécrétases (Saftig *et al.* 1996).

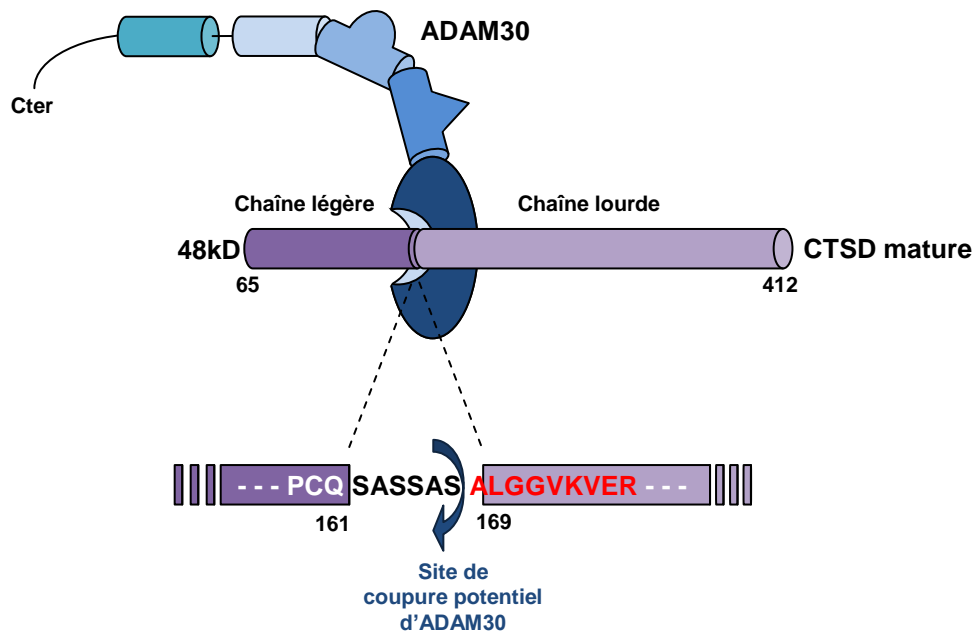


Figure 40. Représentation du site de coupure potentiel d'ADAM30 sur la CTSD. La technique du COFRADIC nous a permis d'obtenir ici en rouge, la séquence du peptide correspondant à la CTSD. Cette technique nous a également permis d'obtenir le site de coupure potentiel d'ADAM30 sur la CTSD. ADAM30 pourrait cliver la CTSD au niveau de son site de clivage activateur et ainsi potentiellement l'activer.

Quenching

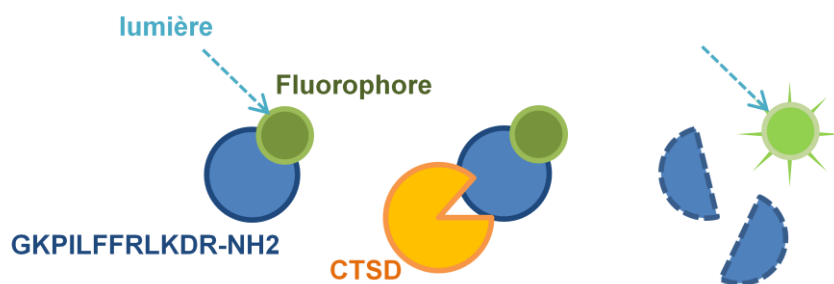


Figure 41.A. Schématisation du principe de quenching utilisé pour la mesure de l'activité de CTSD. Le substrat synthétique et très spécifique de la CTSD est lié à un fluorophore. Dans cette situation, la fluorescence émise normalement par le fluorophore lors de son excitation est absorbée par le substrat. L'ajout de CTSD recombinante humaine conduit au clivage de son substrat permettant la libération du fluorophore. Le fluorophore libéré peut alors émettre de la fluorescence quantifiable lorsqu'il est excité.

3. Caractérisation de la Cathepsine D comme substrat d'ADAM30

3.A. ADAM30 clive et active la CTSD *in vitro*

Sachant que le site de coupure potentiel d'ADAM30 sur la CTSD obtenu par la méthode COFRADIC-SILAC est localisé au niveau de la séquence d'endoprotéolyse nécessaire à l'activation de la CTSD, nous avons supposé qu'ADAM30 pouvait être capable de cliver et d'activer la CTSD (Fig.40). Pour vérifier cette première hypothèse, nous avons utilisé un kit de détection de l'activité de la CTSD *in vitro*. Ce test basé sur la mesure de la fluorescence émise lors de la coupure du substrat de synthèse spécifique de la CTSD (principe du quenching : le substrat de la CTSD de par sa configuration « protège » le fluorophore, le clivage du substrat par la CTSD libère le fluorophore permettant alors l'émission de fluorescence à longueur d'onde spécifique) (Fig.41.A.). La pro-CTSD humaine recombinante est ainsi incubée avec son substrat de synthèse préférentiel seul ou avec une ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} humaine recombinante. Comme attendu, nous avons pu détecter une fluorescence dans les tests réalisés uniquement avec la pro-CTSD et son substrat (Fig.41.B.). En effet, la CTSD est capable de s'autocatalyser et ainsi s'auto activer. Nous avons pu observer que les tests réalisés en présence de l'ADAM30^{wt} présentent une augmentation significative ($p=0,0001$) de fluorescence de près du double par rapport à celle observée dans les tests sans ADAM30. ADAM30 serait donc bien capable de cliver et de favoriser l'activation de la CTSD. En revanche, nous avons pu constater que les tests effectués avec incubation d'ADAM30^{mut} présentent les mêmes niveaux de fluorescence que les tests réalisés sans ADAM30 (Fig.41.B.). Le site catalytique d'ADAM30 semble donc crucial pour sa capacité à cliver et activer la CTSD.

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer ces résultats *in vitro* mais cette fois ci dans notre modèle cellulaire surexprimant stablement l'APP, les HEK293-APP^{695wt}. Le principe et le kit sont les mêmes que précédemment à ceci près que les tests sont effectués sur des extraits de cultures cellulaires HEK293-APP^{695wt} surexprimant un vecteur vide, ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} et les mesures sont effectuées à différents temps, permettant d'évaluer la cinétique d'activation de la CTSD. Comme observé lors des tests *in vitro*, nous avons pu constater que la CTSD est activée dans les cellules n'exprimant pas ADAM30 (Fig.42). Lorsque ces cellules surexpriment ADAM30^{wt}, l'activité de la CTSD est significativement augmentée

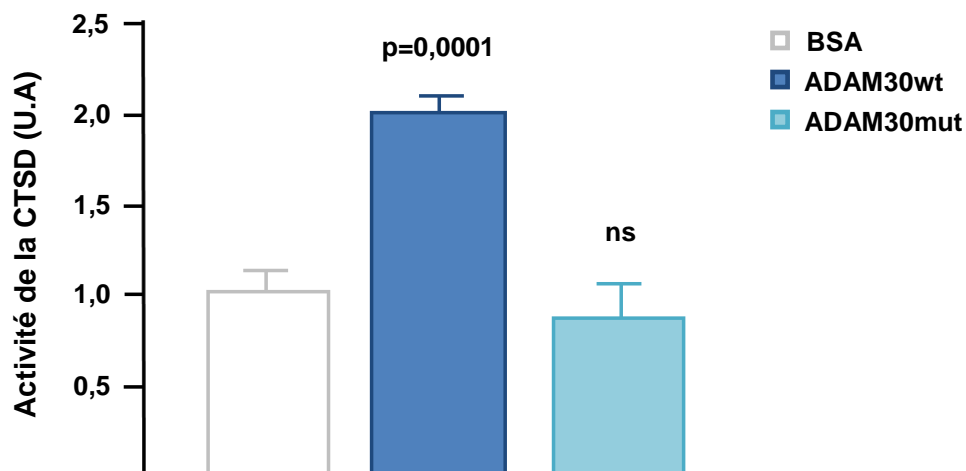


Figure 41.B. Mesure in vitro de l'activité de la CTSD. Mesure réalisée après incubation du substrat synthétique spécifique de la CTSD avec : seulement de la CTSD recombinante humaine (blanc), de la CTSD recombinante humaine et de l'ADAM30^{wt} recombinante humaine (bleu foncé) ou de la CTSD recombinante humaine et de l'ADAM30^{mut} recombinante humaine (bleu clair). Mesures réalisées 5 fois de manière indépendantes. Test statistique: test student.

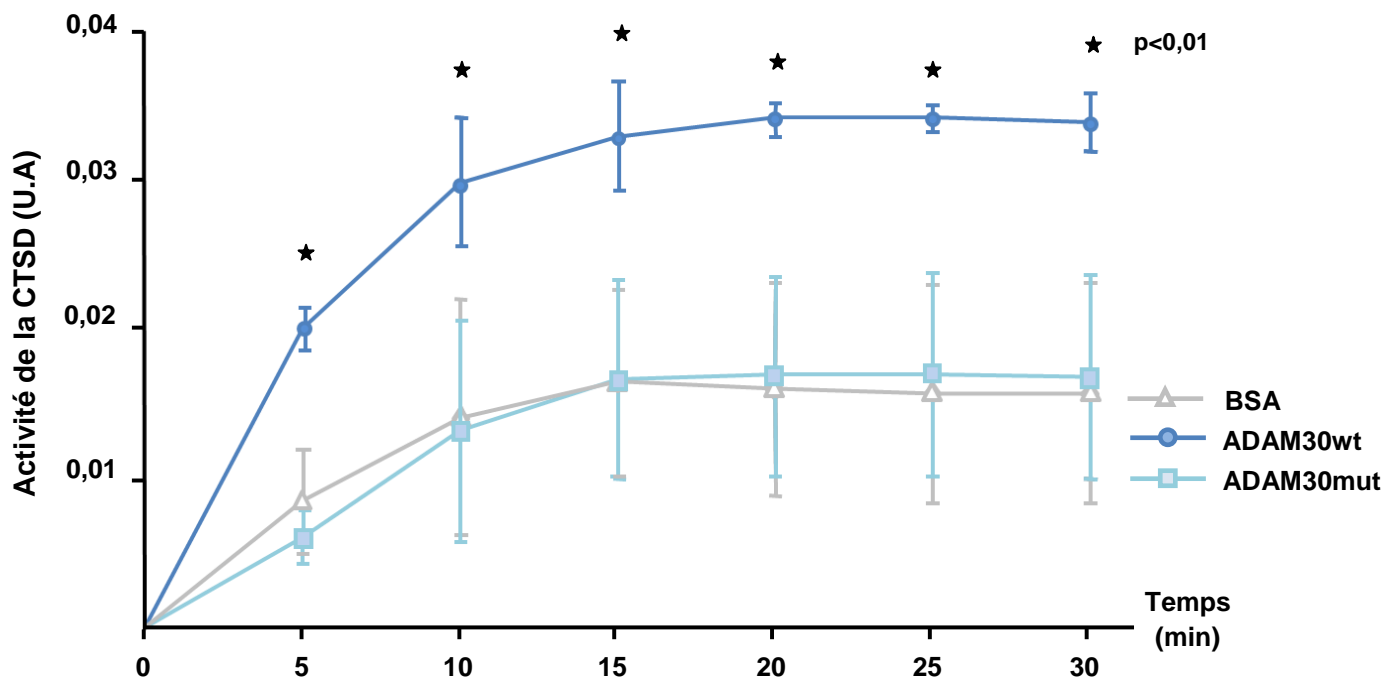


Figure 42. Mesure cinétique de l'activité de la CTSD à partir d'extraits protéiques de cellules HEK293-APP695wt. Ces cellules ont été transfectées soit avec un vecteur vide (BSA) (en gris), un vecteur contenant ADAM30^{wt} (en bleu foncé) ou un vecteur contenant ADAM30^{mut} (en bleu clair). Le kit de mesure de l'activité de la CTSD est le même que celui utilisé in vitro et repose sur l'utilisation d'un substrat synthétique de la CTSD quénchant un fluorophore. Mesures réalisées 5 fois de manière indépendantes. Test statistique: test student.

jusqu'à près de 220% ($p=0,0001$) par rapport à celle constatée dans les cellules exprimant le vecteur vide. A l'inverse, la sur-expression d'ADAM30^{mut} dans nos cellules n'engendre pas d'augmentation d'activité de la CTSD et ne module pas sa cinétique d'activation (Fig.42). Il semblerait donc qu'ADAM30 soit capable d'activer la CTSD dans un modèle cellulaire HEK293-APP^{695wt} et que cette action nécessite la fonctionnalité du domaine catalytique d'ADAM30.

3.B. Activation de la Cathepsine D par ADAM30 *ex vivo*

La validation du clivage et de l'activation de la CTSD par ADAM30 passe par une caractérisation de l'impact d'ADAM30 sur la CTSD *in vivo*. C'est pourquoi, après 10mois de vieillissement, nous avons sacrifié nos souris et extrait le cerveau pour obtenir le cortex. Bien que l'hippocampe soit la zone d'étude principale pour la maladie d'Alzheimer, nous avons choisi d'étudier le cortex pour des raisons techniques (l'hippocampe étant réservé pour les mesures concernant le métabolisme de l'APP). Comme l'hippocampe, le cortex présente une expression de CamkII α /Cre et donc d'ADAM30. Ainsi, nous avons mesuré l'activité de la CTSD dans ces cortex en utilisant le même kit que celui utilisé précédemment, en réalisant deux types de mesures : (1) une mesure au bout de 30min d'incubation avec le substrat de synthèse de la CTSD (Fig.43), et (2) une mesure en cinétique toutes les 5min jusqu'à 30min (Fig.44). Comme précédemment observé *in vitro* pour les tests menés à termes (30min) ou dans nos modèles cellulaires pour les tests de cinétiques, les souris n'exprimant pas ADAM30^{wt}, soit les souris APP^{SweInd} ou encore les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd} (possédant le gène d'ADAM30^{wt} mais ne l'exprimant pas), présentent une activation de la CTSD attendue (Fig.43 et 44). En revanche, chez les souris surexprimant ADAM30^{wt}, soit les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-Cre, on observe une augmentation significative de l'activité de la CTSD de 34% ($p<0,001$) pour les tests réalisés à 30min et de 7% ($p=0,82$) pour les tests réalisés en cinétique, par rapport à l'activité de la CTSD enregistrée chez les souris n'exprimant pas ADAM30. De même, les souris ADAM30^{mut}-APP^{SweInd}-Cre, exprimant un ADAM30^{mut}, présentent un même niveau d'activité de la CTSD que les souris ne surexprimant pas d'ADAM30 (Fig.43 et 44). Il semblerait donc qu'ADAM30 soit capable de cliver et d'activer la CTSD que ce soit

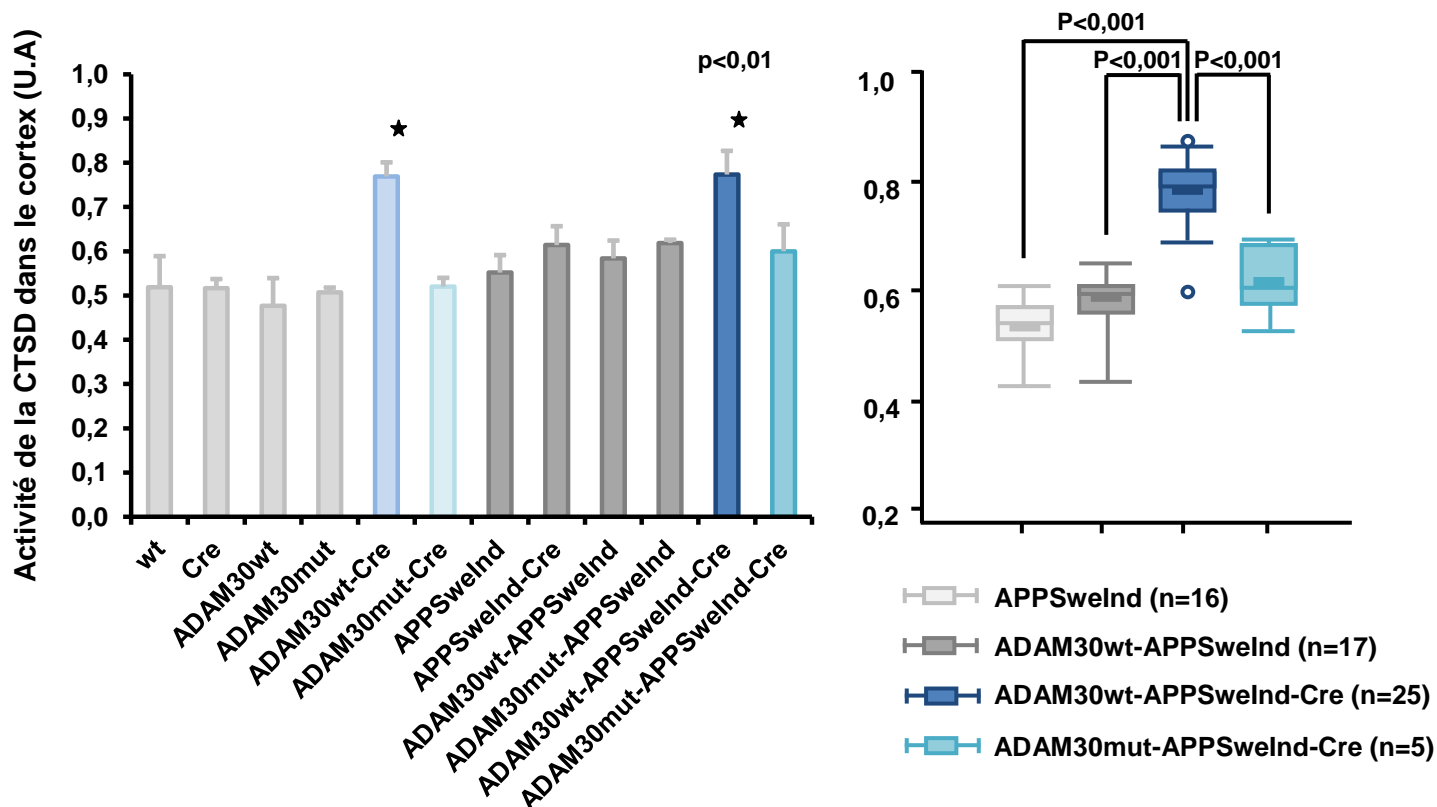


Figure 43. Mesure de l'activité de la CTSD dans le cortex des différentes lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut}. Le kit de détection de l'activité de la CTSD est le même que celui utilisé in cellulo ou in vitro mais adapté pour la mesure de l'activité de la CTSD murine. A droite toutes les lignées sont représentées. Le schéma de gauche correspond à la comparaison du niveau d'expression de la CTSD uniquement dans les principaux groupes de souris d'intérêt. Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les différentes lignées de souris. Ligne fine centrale: moyenne. Lignes fines hautes et basses: premier et troisièmes quartiles. Cercles: animaux présentant des valeurs extrêmes. Mesures réalisées 5 fois de manière indépendantes. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

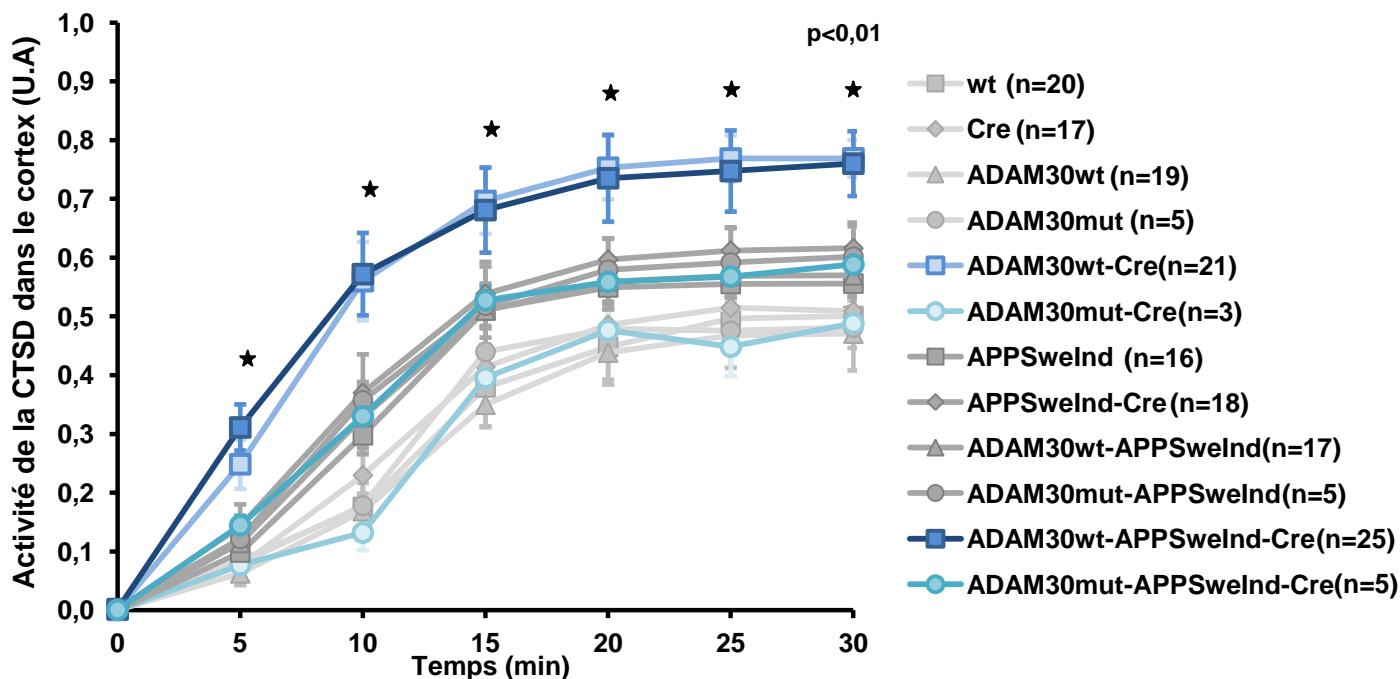


Figure 44. Mesure cinétique de l'activité de la CTSD dans le cortex des différentes lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut}. Même méthode utilisée que pour la figure précédente mais en mesurant l'activité de la CTSD toutes les 5 min entre 0 et 30 min. Mesures réalisées 5 fois de manière indépendantes. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

in vitro ou *in vivo* et cet effet est dans tous les cas dépendant entièrement du domaine catalytique d'ADAM30.

Pour vérifier que l'effet d'ADAM30 sur la CTSD observé *ex vivo* est bien dépendant uniquement du clivage et donc d'une augmentation de l'activité et non d'une augmentation de l'expression de la CTSD en fonction de nos lignées de souris, nous avons quantifié l'expression de la CTSD dans nos cortex. Nous avons pu constater que l'expression de la CTSD ne varie pas quelque soit la lignée de souris étudiée, qu'elle exprime ou non ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} (Fig.45).

Enfin, par comparaison de la mesure de la concentration en A β ₁₋₄₂ et de l'activité de la CTSD dans nos souris âgées de 10mois, nous avons pu observer une corrélation significativement négative ($p < 0,05$) entre la concentration en A β ₁₋₄₂ et l'activité de la CTSD uniquement dans le cerveau des souris triple transgéniques ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-Cre (comparaison effectuée à l'aide d'un test de corrélation de Spearman) (Fig.46). Ainsi, ce dernier résultat tend à renforcer le lien entre ADAM30, la CTSD et les dépôts amyloïdes.

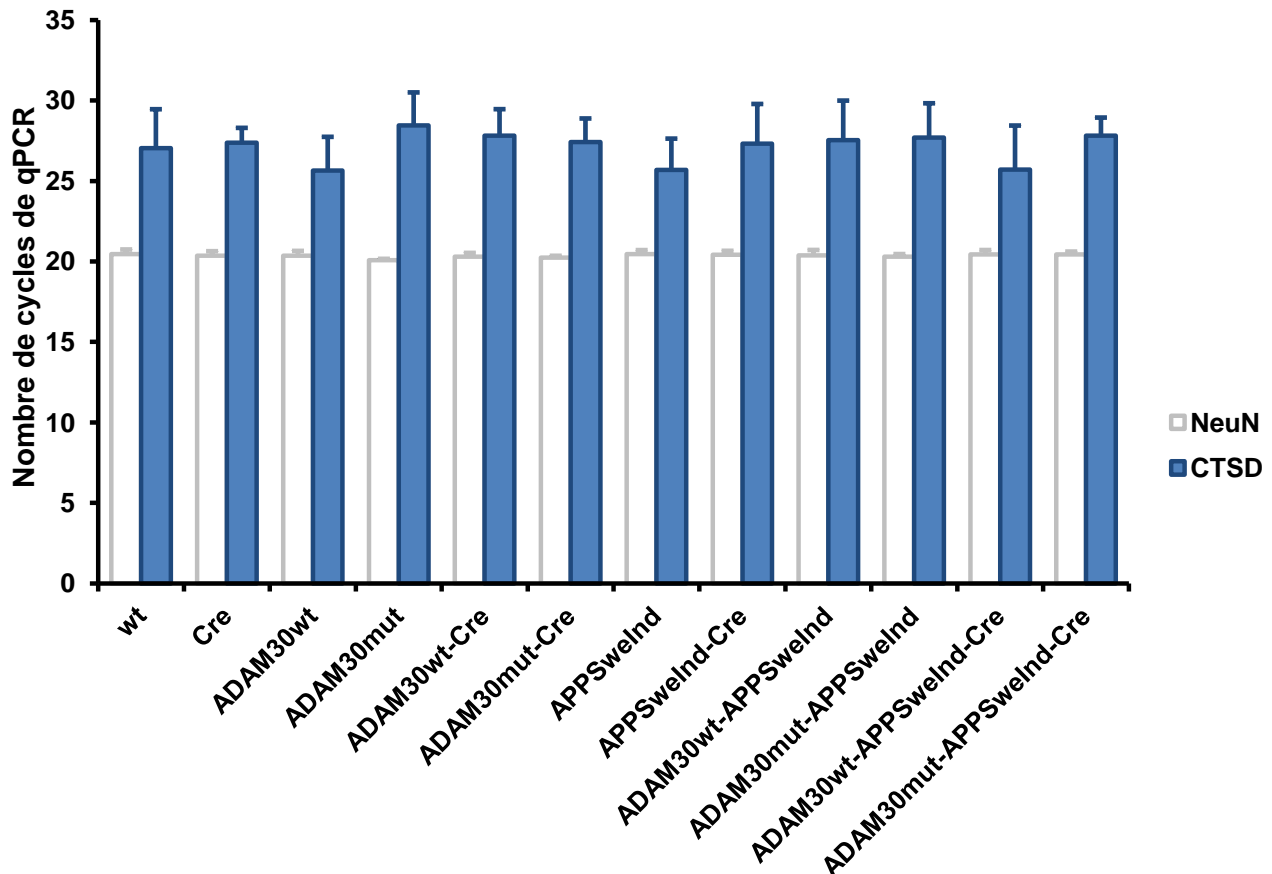


Figure 45. Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression de la CTSD dans nos lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut}. Plus le nombre de cycle de qPCR est élevé, moins l'expression du gène est forte. Le gène NeuN neuronal est utilisé comme gène de référence endogène pour le niveau d'expression des transgènes. Aucune différence significative n'a pu être observée en utilisant un test de student.

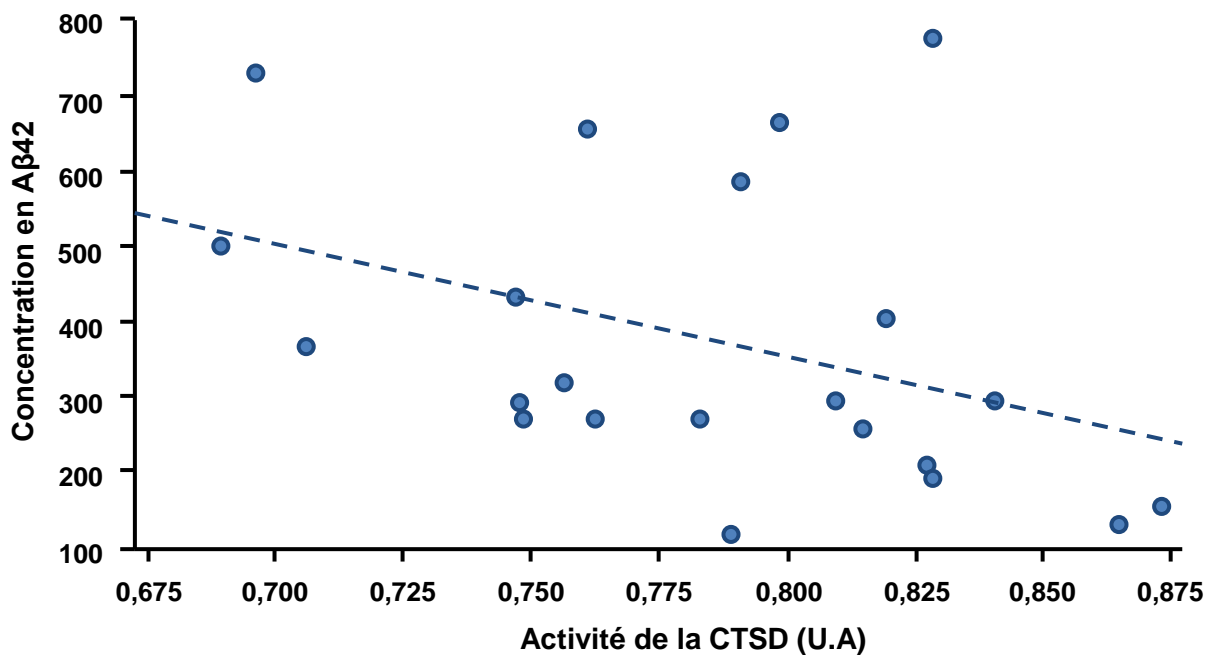


Figure 46. Corrélation entre l'activité de la CTSD dans le cortex (Fig.43) et la concentration en Aβ42 solubles hippocampique chez les souris triple transgéniques exprimant le transgène ADAM30^{wt} (souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-Cre) (Fig.33). Test statistique: test non-paramétrique de Spearman.

3.C. ADAM30 et la CTSD colocalisent dans les mêmes compartiments cellulaires

ADAM30 étant capable de cliver et d'activer la CTSD, il est donc nécessaire que ces deux protéines colocalisent. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons transfecté nos cellules HEK293-APP^{695wt} avec ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} puis observé par immunofluorescence la localisation d'ADAM30 et de la CTSD à l'aide de leurs anticorps spécifiques. En parallèle, nous avons également utilisé une autre technique de localisation qui permet aussi de visualiser la proximité (et potentiellement l'interaction) entre deux protéines. Cette technique du PLA (Proximity Ligation Essay) repose sur l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à des sondes nucléotidiques compatibles (une – et une +) (Fig.47). Si deux protéines interagissent ou sont suffisamment proches, les sondes s'associent entre elles formant ainsi des doubles brins. Par réaction de PCR, ces sondes sont amplifiées une infinité de fois formant ainsi un long double brin d'ADN dans lequel viennent se fixer des sondes fluorescentes. Ces liaisons permettent donc de ne faire fluorescer que les « couples » de protéines, facilement identifiables alors par un point vert. Grâce à ces deux techniques, nous avons pu constater que notre ADAM30 surexprimée colocalise avec la CTSD endogène dans nos cellules HEK293-APP^{695wt} (Fig.48).

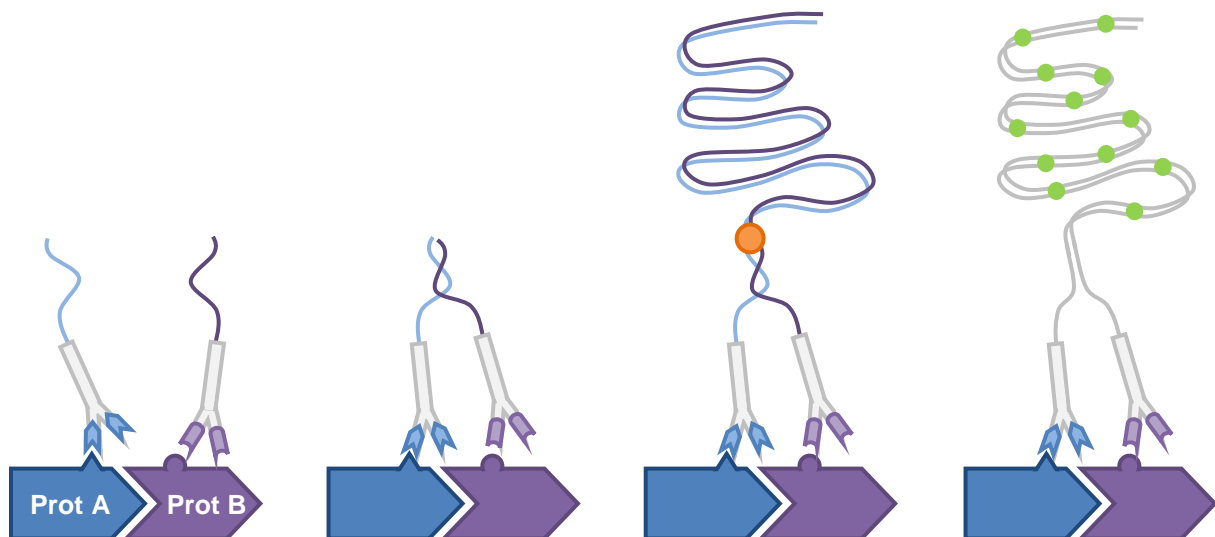


Figure 47. Représentation schématique de la technique du Proximity Ligation Assay ou PLA. Lorsque les deux protéines cibles (ici A et B) sont proches (distance inférieure à 40nm), les sondes nucléotidiques complémentaires fixées sur les anticorps ciblant ces protéines vont pouvoir s'hybrider. Par réaction de PCR classique, ce fragment va pouvoir être amplifié pour former une longue séquence d'ADN sur laquelle vont pouvoir venir se fixer des petites sondes nucléotidiques couplées à un fluorophore. Ces dernières permettent ainsi de visualiser l'interaction potentielle entre les deux protéines A et B.

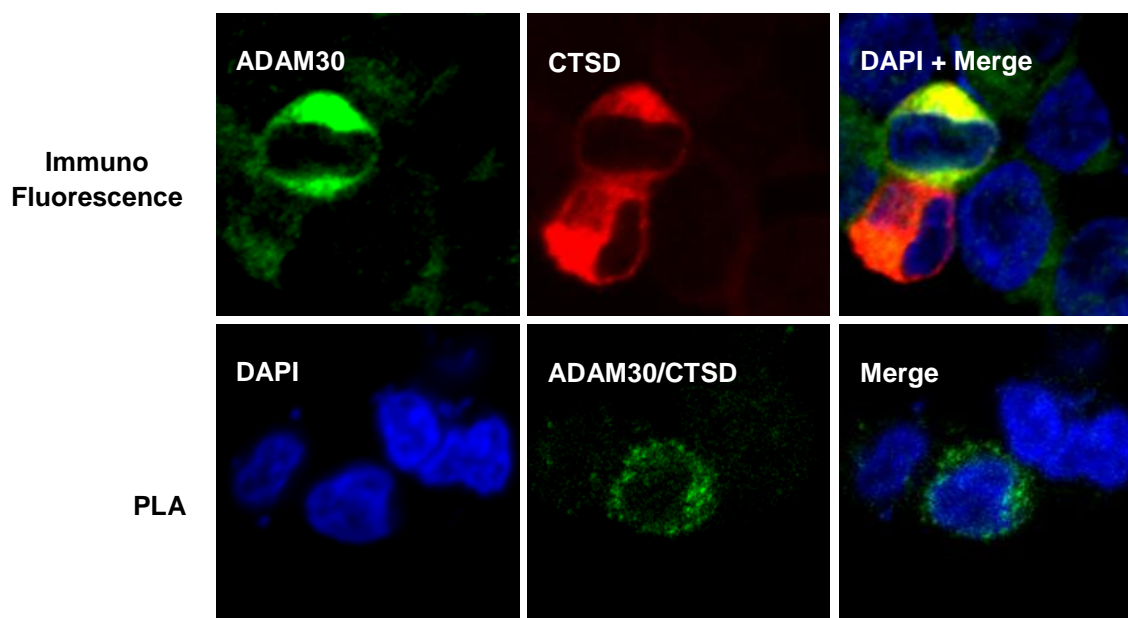


Figure 48. Colocalisation d'ADAM30 surexprimé et de la CTSD endogène. Immunofluorescences et PLAs réalisés dans les cellules HEK293-APP^{695wt}. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur d'expression d'ADAM30 et celui de la CTSD. Pour le merge, les cellules ont été traitées au DAPI afin de visualiser les noyaux. Puis les fluorescences d'ADAM30 et de la CTSD ont été superposées à la coloration au DAPI pour visualiser une potentielle colocalisation. Les spots de fluorescences verts obtenus pour la technique du PLA correspondent à une proximité très importante de la CTSD et d'ADAM30. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes.

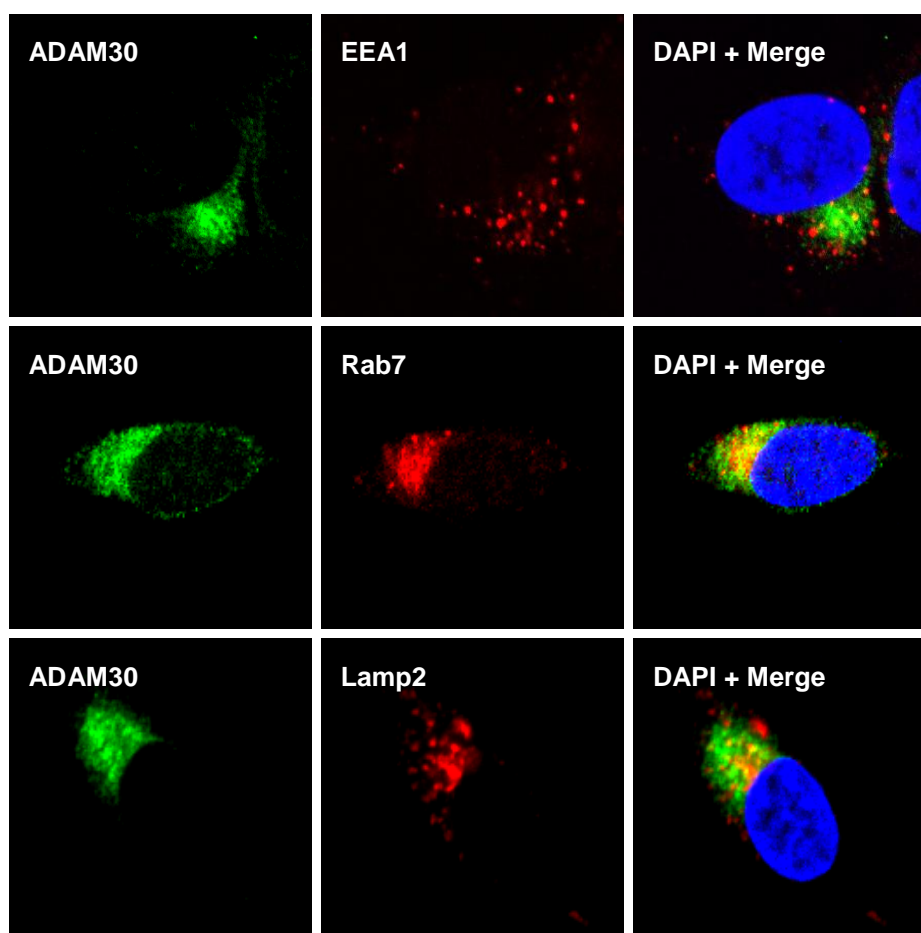


Figure 49. Colocalisation d'ADAM30 avec les marqueurs de l'endosome tardif et celui du lysosome. Immunofluorescences réalisées sur les cellules HEK293-APP^{695wt} transfectées avec ADAM30. Les différents marqueurs des compartiments cellulaires ciblés sont EEA1 pour l'endosome précoce, Rab7 pour l'endosome tardif et Lamp2 pour le lysosome. Pour le merge, les cellules ont été traitées au DAPI afin de visualiser les noyaux. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes.

S'il est connu que la CTSD est une protéine lysosomale retrouvée dans les vésicules de la voie endosome/lysosome, la localisation cellulaire d'ADAM30 n'a pour l'instant pas été identifiée. Sachant qu'ADAM30 et la CTSD semblent colocaliser, nous avons voulu rechercher si cette colocalisation avait lieu dans les vésicules de la voie endosome/lysosome. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence nous permettant d'observer la colocalisation potentielle d'ADAM30 et de différents marqueurs des vésicules de la voie endosome/lysosome dans nos cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} (Fig.49). ADAM30 et EEA1, un marqueur des endosomes précoces, ne montrent aucune colocalisation. Alors qu'une faible colocalisation est observée entre ADAM30 et LAMP2, un marqueur du lysosome, la plus forte colocalisation semble être observée entre ADAM30 et Rab7, un marqueur des endosomes tardifs. De façon intéressante, nous n'observons aucune différence de colocalisation lorsque nous surexprimons ADAM30^{mut} (Fig.49).

D'après tous ces résultats et du fait que les endosomes tardifs et les lysosomes soient les lieux connus d'activation de la CTSD et de son action en tant que protéase (Benes *et al.* 2008), ADAM30 et la CTSD pourraient colocaliser au sein de ces compartiments. La mutation du site catalytique d'ADAM30 ne semblerait pas modifier cette localisation.

4. La modulation du métabolisme de l'APP par ADAM30 nécessite une activation spécifique de la CTSD et une séquence consensus sur l'APP

4.A. Inhibition des cathepsines

Bien que les résultats précédents semblent valider la CTSD comme substrat activé par ADAM30, la technique du COFRADIC-SILAC peut omettre des protéines possédant des séquences proches ou des homologues des substrats potentiels d'ADAM30. Ainsi, nous avons voulu savoir si cette capacité d'ADAM30 d'activer la CTSD était spécifique à cette cathepsine ou si d'autres protéines de la même famille pouvaient être activées par ADAM30. En effet, la CTSD n'est pas la seule cathepsine à être impliquée dans le métabolisme et la dégradation de l'APP. Il a été montré que la CTSD et la CTSB participent toutes deux au métabolisme de l'APP et

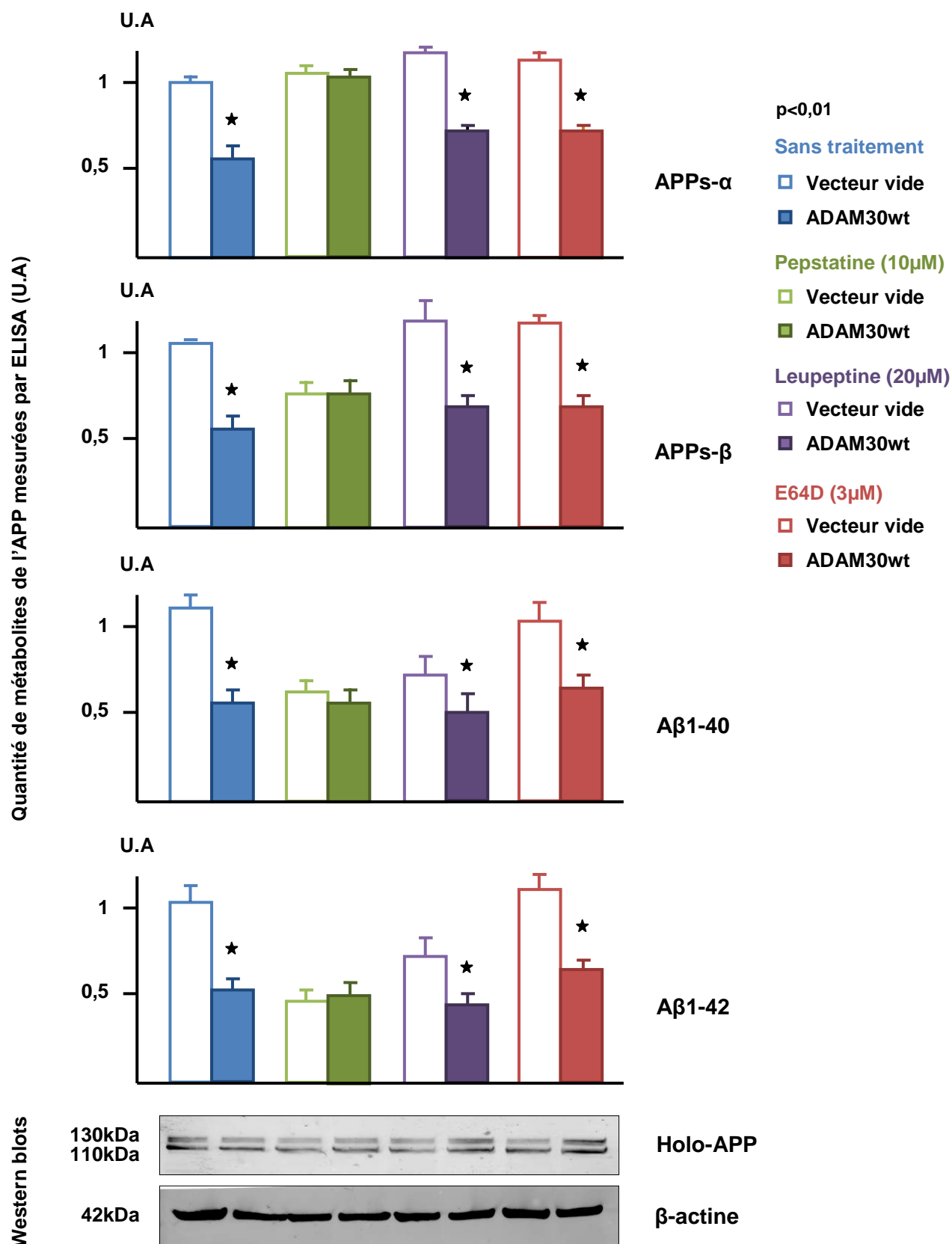


Figure 50. L'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP passe spécifiquement par l'activité de la CTSD. Mesure du métabolisme de l'APP par ELISAs et WB après traitement à la pepstatine, leupeptine ou E64D des cellules HEK293-APP^{695wt} transfectées avec un vecteur vide, ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut}. La pepstatine est l'inhibiteur le plus spécifique de la CTSD à ce jour, la leupeptine inhibe les cystéines et sérines protéases et l'E64D inhibe la CTSB la CTSL, et la papaine. Les traitements sont réalisés pendant 16h aux concentrations indiquées, 24 heures après transfection. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes. Test statistique: test student.

sont impliquées dans la production du peptide amyloïde (Dreyer *et al.* 1994, Mackay *et al.* 1997, Haque *et al.* 2008). Ainsi pour inclure ou écarter la CTSB des substrats potentiels d'ADAM30 intervenant dans le métabolisme de l'APP, nous avons utilisé une série d'inhibiteurs des cathepsines spécifiques ou ubiquitaires. Après sur-expression d'un vecteur vide ou d'ADAM30^{wt}, nos cellules HEK293-APP^{695wt} sont traitées (ou non) avec un inhibiteur de cathepsines. La Pepstatine A (à ce jour l'inhibiteur le plus spécifique de la CTSD bien qu'il inhibe aussi la CTSE) est un inhibiteur des aspartyl-protéases ; l'inhibiteur utilisé pour la CTSB est la Leupeptine, un inhibiteur des sérine, cystéine et thréonine protéases ; et enfin l'E64D, un inhibiteur non sélectif des cystéines, cible autant la CTSB que la CTSL, la papaïne ou la calpaïne.

Comme attendu et en accord avec la littérature, les cellules traitées avec les inhibiteurs de la CTSD ou de la CTSB présentent une diminution de la quantité d'Aβ1-40 et d'Aβ1-42 mesurée par ELISAs (Fig.50). Aussi, pour les cellules traitées à la Leupeptine, malgré la diminution de la quantité de métabolites entraînée par le traitement, nous avons pu constater que les cellules surexprimant ADAM30^{wt} présentent une plus faible quantité de métabolites sécrétés que les cellules surexprimant un vecteur vide (APPs-α : -52%, APPs-β : -49%, Aβ1-40 : -24%, Aβ1-42 : -31% par rapport aux cellules ne surexprimant pas ADAM30^{wt}) (Fig.50). Un résultat similaire est obtenu lorsque ces cellules sont traitées à l'E64D. En revanche les cellules traitées à la Pepstatine A, exprimant ou non ADAM30^{wt}, ne présentent plus de diminution de la quantité de métabolites de l'APP sécrétés observée normalement lors de la sur-expression d'ADAM30 (APPs-α : 0%, APPs-β : +2%, Aβ1-40 : +1%, Aβ1-42 : +4% par rapport aux cellules ne surexprimant pas ADAM30^{wt}) (Fig.50). Il semblerait donc que seule la Pepstatine A, inhibiteur de la CTSD, soit capable d'empêcher l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP. L'effet d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP semblerait donc uniquement dépendant de l'activité de la CTSD.

4.B. Inhibition des différentes voies de dégradation cellulaire

La CTSD est une protéase de la voie endosome/lysosome et nous avons pu montrer qu'ADAM30 et la CTSD semblent colocaliser dans ces compartiments où

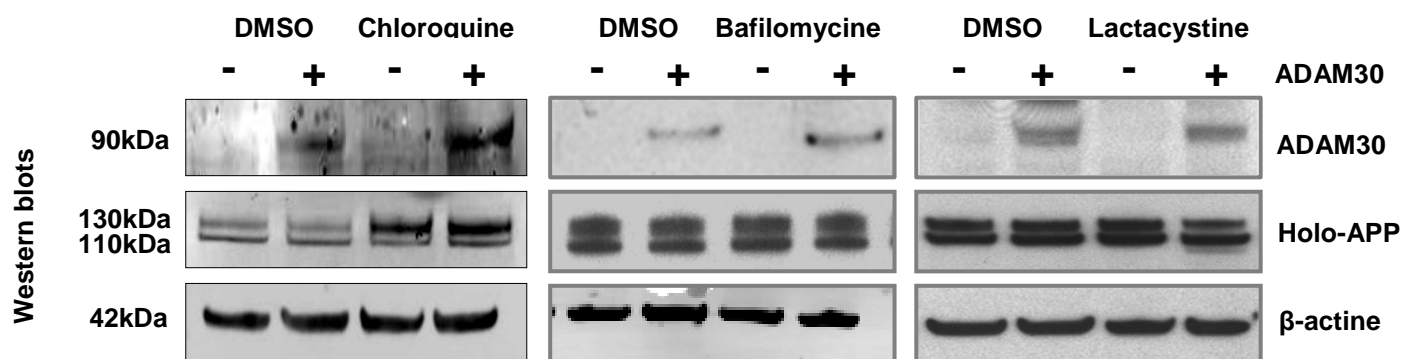
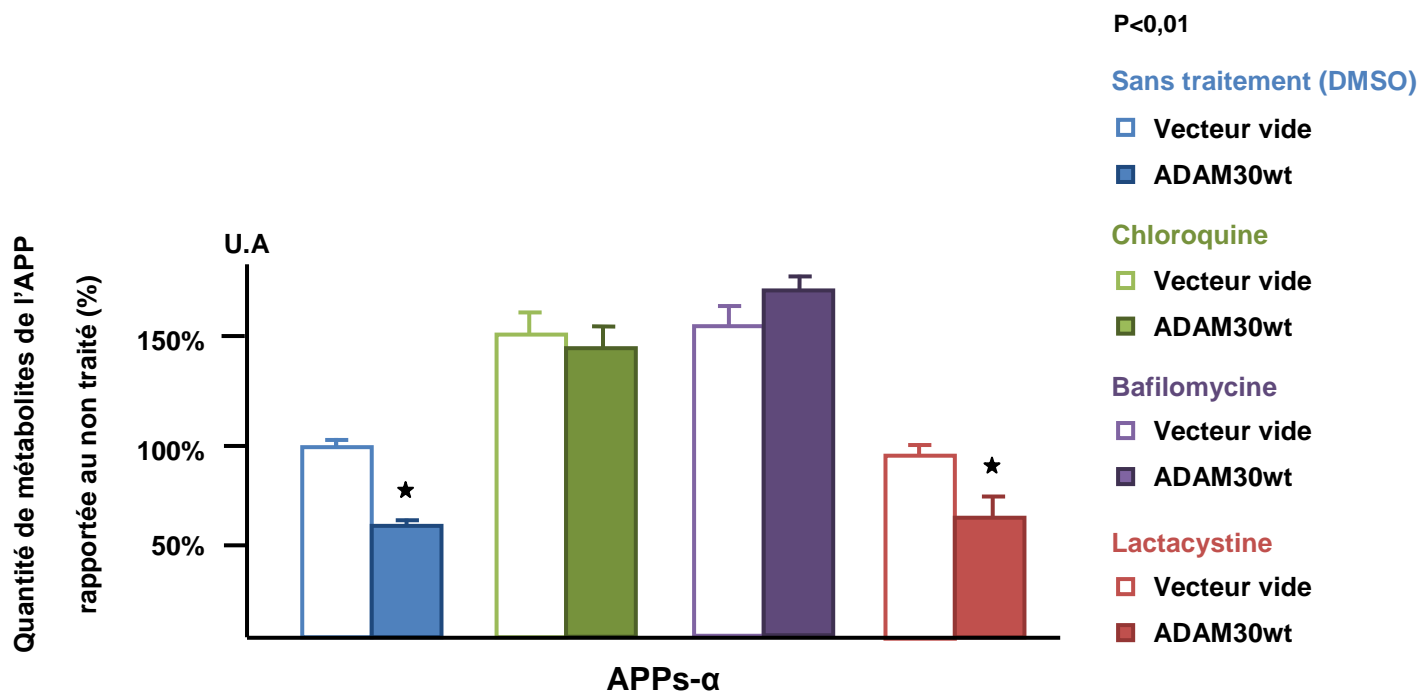


Figure 51. L'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP passerait par la voie endosome/lysosome, lieu d'activité de la CTSD. Mesure du métabolisme de l'APP par ELISAs et WB après transfection des cellules HEK293-APP^{695wt} un vecteur vide ou le vecteur d'expression d'ADAM30^{wt}. 24 heures après transfection, différents traitements inhibiteurs ont été effectués. Les traitements de 16 heures à la Chloroquine et à la Bafilomycine inhibent la voie endosome/lysosome. Le traitement de 5 heures à la lactacystine inhibe le protéasome, autre voie de dégradation essentielle dans la cellule mais ne faisant pas intervenir la CTSD. Seuls les APPs-α ont pu être quantifiés par ELISA du fait de l'inhibition de la voie endosome/lysosome, conduisant à l'inhibition de la voie amyloïdogène de l'APP et donc à la non production des APPs-β et des Aβ. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes. Test statistique: test student.

ADAM30 activerait la CTSD pour faciliter la dégradation de l'APP. Pour vérifier l'importance de cette voie de dégradation endosome/lysosome, nous avons utilisé des inhibiteurs des différentes voies de dégradation majoritaires dans la cellule : la voie de l'endosome/lysosome et le protéasome (Fig.51). La Bafilomycine est un inhibiteur du lysosome. Cet agent empêche l'acidification du lysosome en bloquant les pompes à protons vacuolaires. La chloroquine est un agent lysosomotropique (qui s'accumule au niveau des lysosomes) dont l'effet principal est l'inhibition de l'autophagie par inhibition du lysosome. Enfin, la lactacystine se fixe sur les sous-unités catalytiques du protéasome et inhibe l'action du complexe du protéasome. Après transfection avec un vecteur vide ou ADAM30^{wt}, les cellules HEK293-APP^{695wt} sont traitées avec la bafilomycine, la chloroquine, la lactacystine ou avec le DMSO. Nous avons pu mesurer dans les cellules traitées avec les inhibiteurs du lysosome, la Bafilomycine et la Chloroquine, une quantité plus importante d'APP (holo-APP par WB) et d'APPs- α (ELISA), alors que les APPs- β , A β 1-40 et A β 1-42 n'étaient plus détectables (ELISA) (Fig.51). Ces résultats sont attendus puisque l'inhibition du lysosome neutralise la voie amyloïdogène (inhibant alors la production d'A β) entraînant ainsi une accumulation d'APP dans les cellules et une augmentation de la voie non-amyloïdogène (d'où l'augmentation de la quantité d'APPs- α sécrétés). Cet effet n'est pas constaté pour les cellules traitées au DMSO ou avec l'inhibiteur du protéasome, la Lactacystine (Fig.51). Nous avons également pu constater que la sur-expression d'ADAM30^{wt} ne provoque pas de diminution du métabolisme de l'APP dans les cellules traitées avec les inhibiteurs du lysosome, contrairement aux cellules traitées avec le DMSO ou avec l'inhibiteur du protéasome (Fig.51). Il semblerait donc qu'une inhibition du lysosome abolie l'effet d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP.

Nous avons montré précédemment que la sur-expression d'ADAM30^{wt} dans les cellules HEK293-APP^{695wt} n'entraînait pas de modification de l'endocytose de l'APP membranaire (voir chapitre 2.A.). Aussi grâce à ces résultats et à ceux obtenus sur la voie endosome/lysosome avec ADAM30, nous avons supposé qu'ADAM30 pouvait être impliquée dans la dégradation de l'APP en activant spécifiquement la cathepsine D au sein de la voie endosome/lysosome. Pour consolider cette hypothèse, nous avons traité nos lignées stables HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} ou HEK293-APP^{695wt} avec la bafilomycine, la pepstatine ou encore la leupeptine et nous avons mesuré l'accumulation de l'APP intracellulaire (Fig.52).

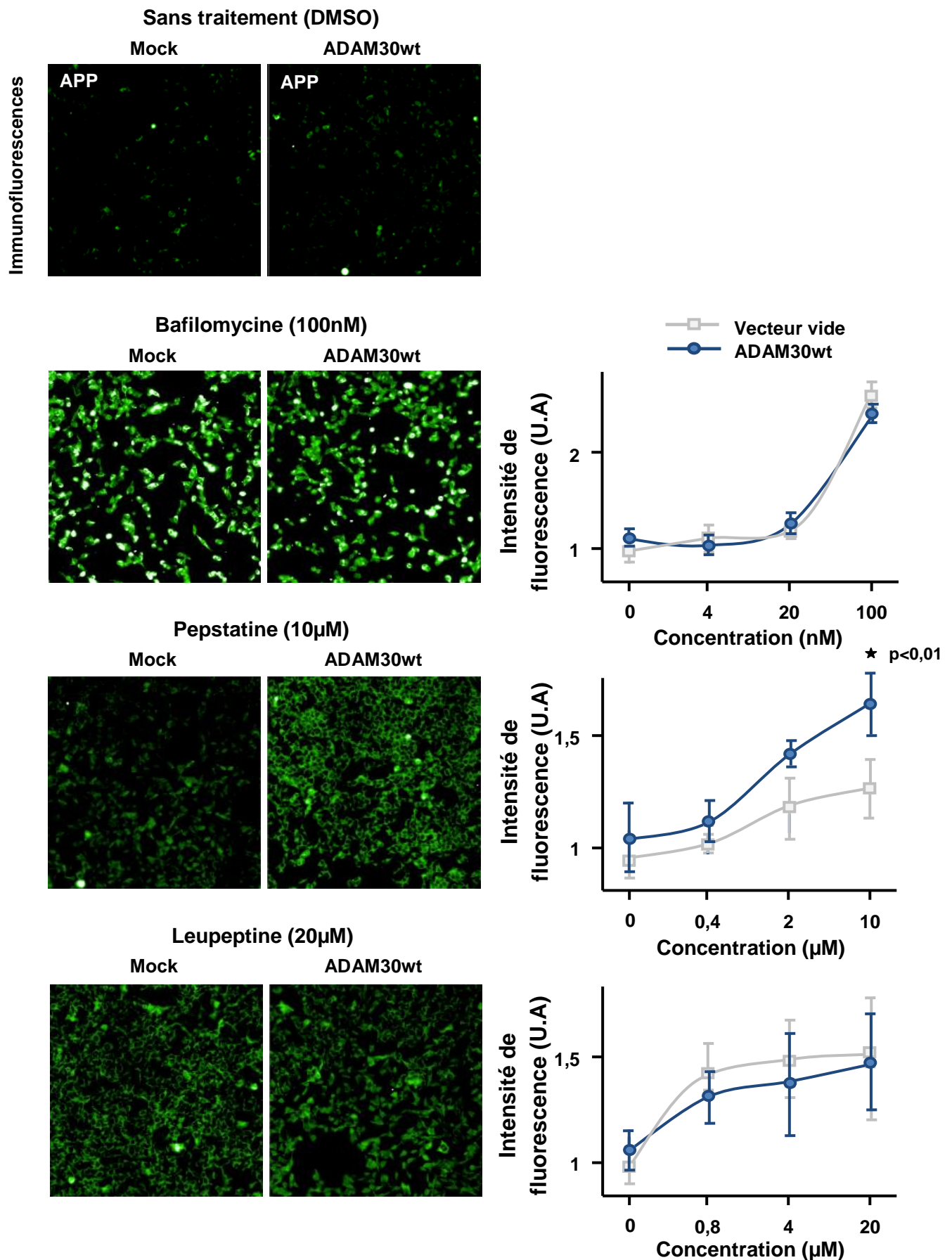


Figure 52. Impact d'ADAM30 sur l'accumulation d'APP intracellulaire. Expérience réalisée par immunofluorescence dans les cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant un vecteur vide ou ADAM30^{wt}. Ces cellules ont été traitées avec différents inhibiteurs, la bafilomycine, la pepstatine et la leupeptine, empêchant ainsi une partie ou toute dégradation de l'APP dans les cellules. Cet APP va alors s'accumuler. Les quantifications ont été effectuées en mesurant la fluorescence des images de gauche. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes. Test statistique: test student.

Dans ces lignées non traitées, nous avons pu confirmer les résultats obtenus précédemment avec nos lignées HEK293-APP^{695wt} surexprimant ADAM30^{wt} ou un vecteur vide (voir chapitre 2.A.) à savoir aucune modification de l'accumulation de l'APP en présence d'ADAM30^{wt} (Fig.52). En traitant nos cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} avec l'inhibiteur de la CTSD, la Pepstatine, nous avons pu constater une augmentation de près de 51% ($p < 0,01$) de l'accumulation d'APP intracellulaire par rapport aux cellules HEK293-APP^{695wt} également traitées (Fig.52). Cette accumulation a été observée de deux façons : 1) directement par imagerie en immunofluorescence et 2) en mesurant l'intensité de la fluorescence obtenue en faisant croître la concentration en Pepstatine jusqu'à atteindre 10 μ M. Cette accumulation n'est pas obtenue lorsque les cellules HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} et HEK293-APP^{695wt} sont traitées avec l'inhibiteur du lysosome, la Bafilomycine, ou l'inhibiteur de la CTSB, la Leupeptine (Fig.52). Aucune différence d'accumulation de l'APP n'est observée entre les deux lignées quelque soit le traitement et la concentration utilisée. Ainsi, ces résultats indiqueraient que la dégradation et l'accumulation de l'APP dans la cellule résulte d'une balance entre l'activation ou non de la CTSD spécifiquement médiée par ADAM30.

4.C. Mutation des différentes séquences consensus le l'APP-Cter

Afin de comprendre la spécificité d'action d'ADAM30 pour la CTSD et le métabolisme de l'APP, nous avons analysé l'importance de la partie C-terminale de l'APP. En effet, il existe dans cette partie, et plus précisément dans ces 15 derniers acides aminés, différentes séquences d'adressage de l'APP vers des compartiments cellulaires, vers des voies de dégradation, ou encore des motifs d'internalisation (Fig.53). Dans ces sites consensus essentiels sont retrouvés : 1) un motif Y₆₈₂ENPTY₆₈₇ nécessaire à l'endocytose de l'APP, 2) une Thréonine en position 668 (sur l'APP⁶⁹⁵) phosphorylable importante dans la régulation de la dégradation de l'APP après endocytose, 3) une séquence YxxØ (où Ø est un acide aminé très hydrophobe) permettant à l'APP d'être transloqué dans le lysosome et en enfin 4) un motif KFERQ potentiellement essentiel pour la voie du CMA (autophagie régulée par des protéines chaperonnes) (Fig.53).

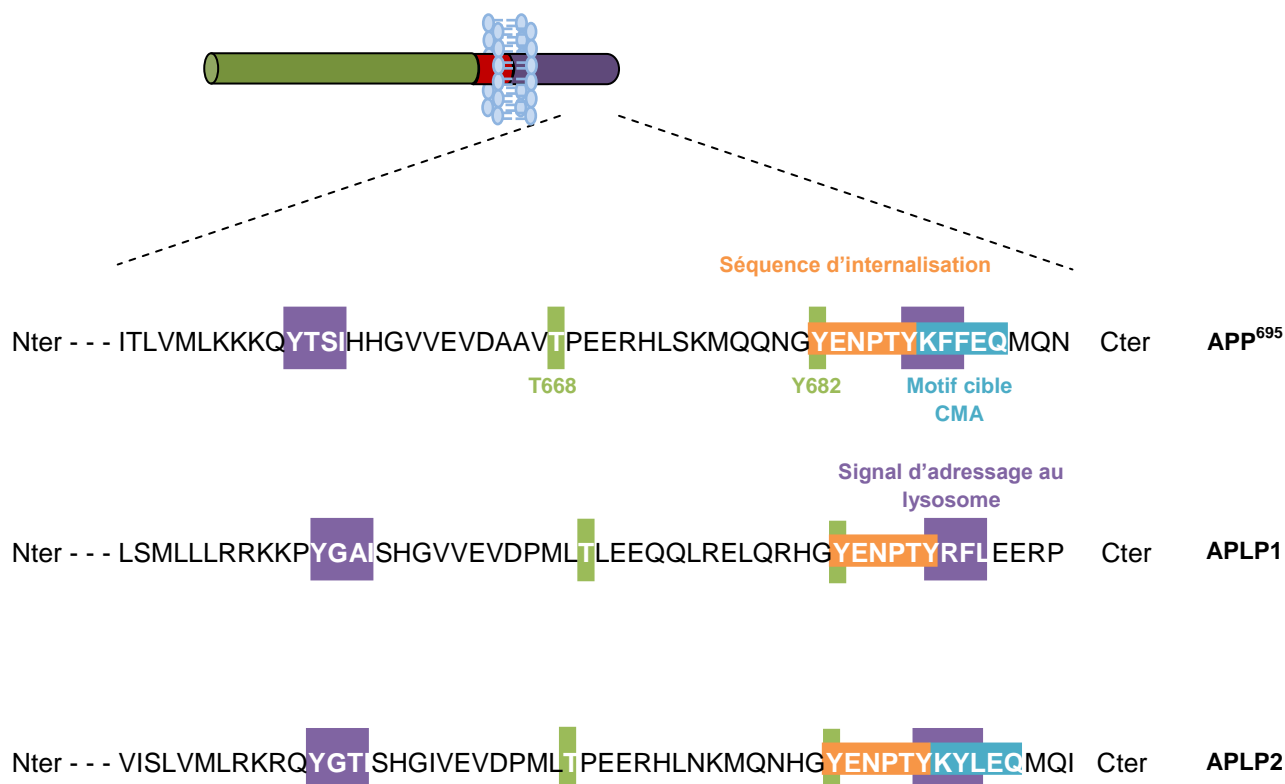
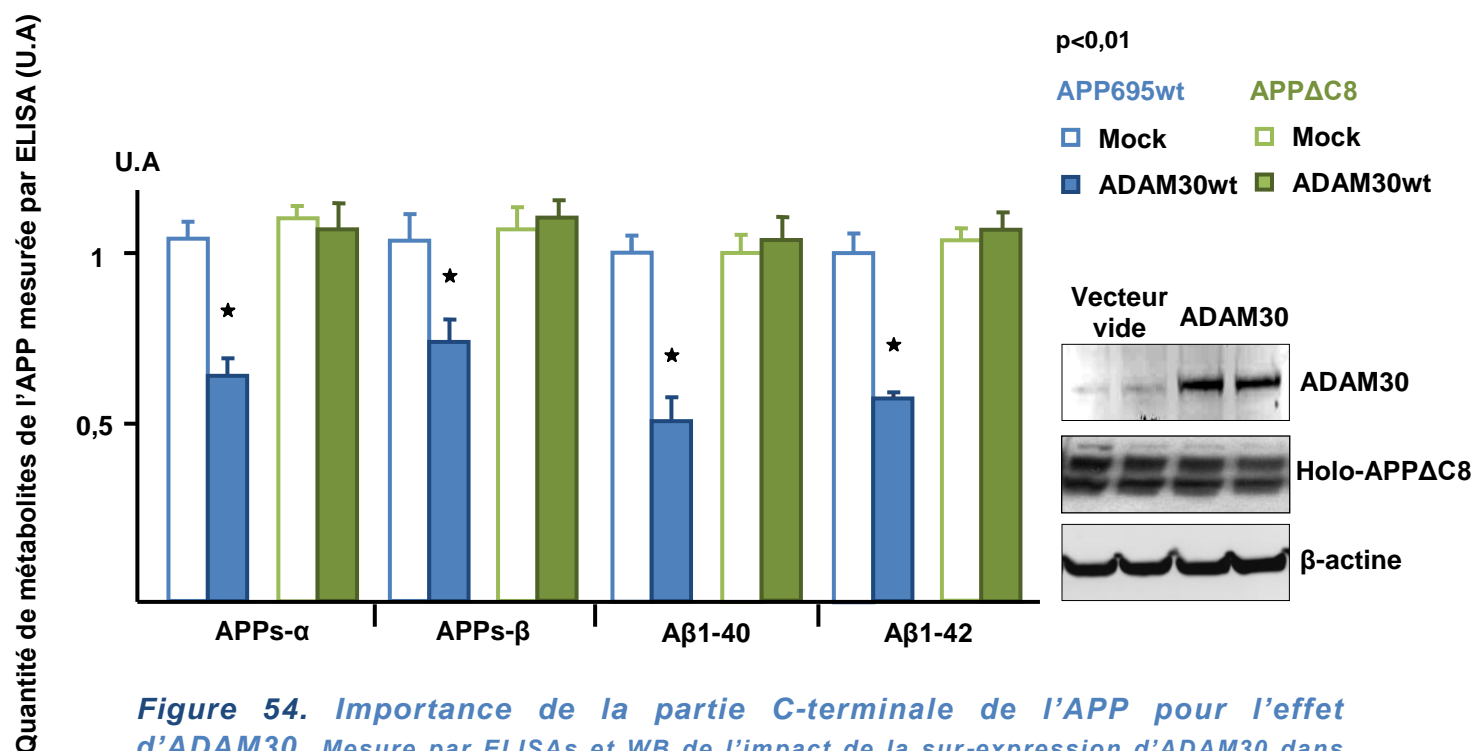


Figure 53. Motifs spécifiques présents dans la partie C-terminale de l'APP⁶⁹⁵, de l'APLP1 et de l'APLP2. En orange, la séquence d'internalisation est impliquée dans l'internalisation de l'APP depuis la membrane. La séquence d'adressage au lysosome en violet permet de contrôler l'adressage de l'APP vers ce compartiment, Le motif du CMA (l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes) est ici potentiel.



Nous avons alors réalisé un mutant de l'APP présentant une délétion des 8 derniers acides aminés C-terminaux nommé APP Δ C8. Cette mutation de la lysine en position 688 en un codon STOP génère un APP dont la plupart des sites consensus C-ter de l'APP sont délétés mais laisse intacte la séquence d'endocytose Y₆₈₂ENPTY₆₈₇ (Fig.53). Ainsi en surexprimant cet APP Δ C8 et ADAM30^{wt} dans nos cellules HEK293, nous avons pu constater que, comme attendu, la délétion des 8 derniers acides aminés de semble pas modifier la production des différents métabolites de l'APP puisque la séquence d'endocytose a été épargnée (Fig.54). Par contre, la diminution des produits du métabolisme de l'APP normalement engendrée par ADAM30 n'est plus observable contrairement aux résultats obtenus dans les cellules surexprimant un APP^{695wt} (Fig.54). Il semblerait donc que la partie C-terminale de l'APP soit capitale pour l'action d'ADAM30.

Pour déterminer quelle séquence consensus pourrait être responsable de cette spécificité, nous avons réalisé des mutations de ces différents motifs. Nous avons dans un premier temps muté la phénylalanine en sérine en position 690 (APP^{F690S}) pour modifier la séquence d'adressage au lysosome Y₆₈₇KFF₆₉₀ (Fig.55). Comme pour les cellules HEK293 précédemment co-transfectées avec l'APP Δ C8 et ADAM30^{wt}, la diminution des produits du métabolisme de l'APP observée dans les cellules surexprimant un APP^{695wt} n'est plus constatée lors de la co-sur-expression de l'APP^{F690S} avec ADAM30^{wt}. De plus, nous avons également réalisé une seconde mutation, cette fois-ci de l'acide glutamique en valine en position 691 (APP^{E691V}) (Fig.55). Cette nouvelle mutation se situe en aval et donc en dehors de la séquence d'adressage au lysosome (Fig.53). Contrairement à ce qui a été observé avec la sur-expression de l'APP^{F690S} avec ADAM30^{wt}, une diminution de la quantité des différents produits du métabolisme de l'APP est constatée que ce soit dans les cellules HEK293 co-surexprimant l'APP^{E691V} avec ADAM30^{wt} ou dans les cellules HEK293 co-surexprimant l'APP^{695wt} avec ADAM30^{wt} (Fig.55). Ces résultats semblent donc indiquer que seule une mutation de la séquence d'adressage au lysosome conduise à une perte de l'impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP. Cette séquence d'adressage au lysosome serait donc capitale pour l'effet d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP et passerait par l'activation ciblée de la CTSD au sein de la voie endosome/lysosome.

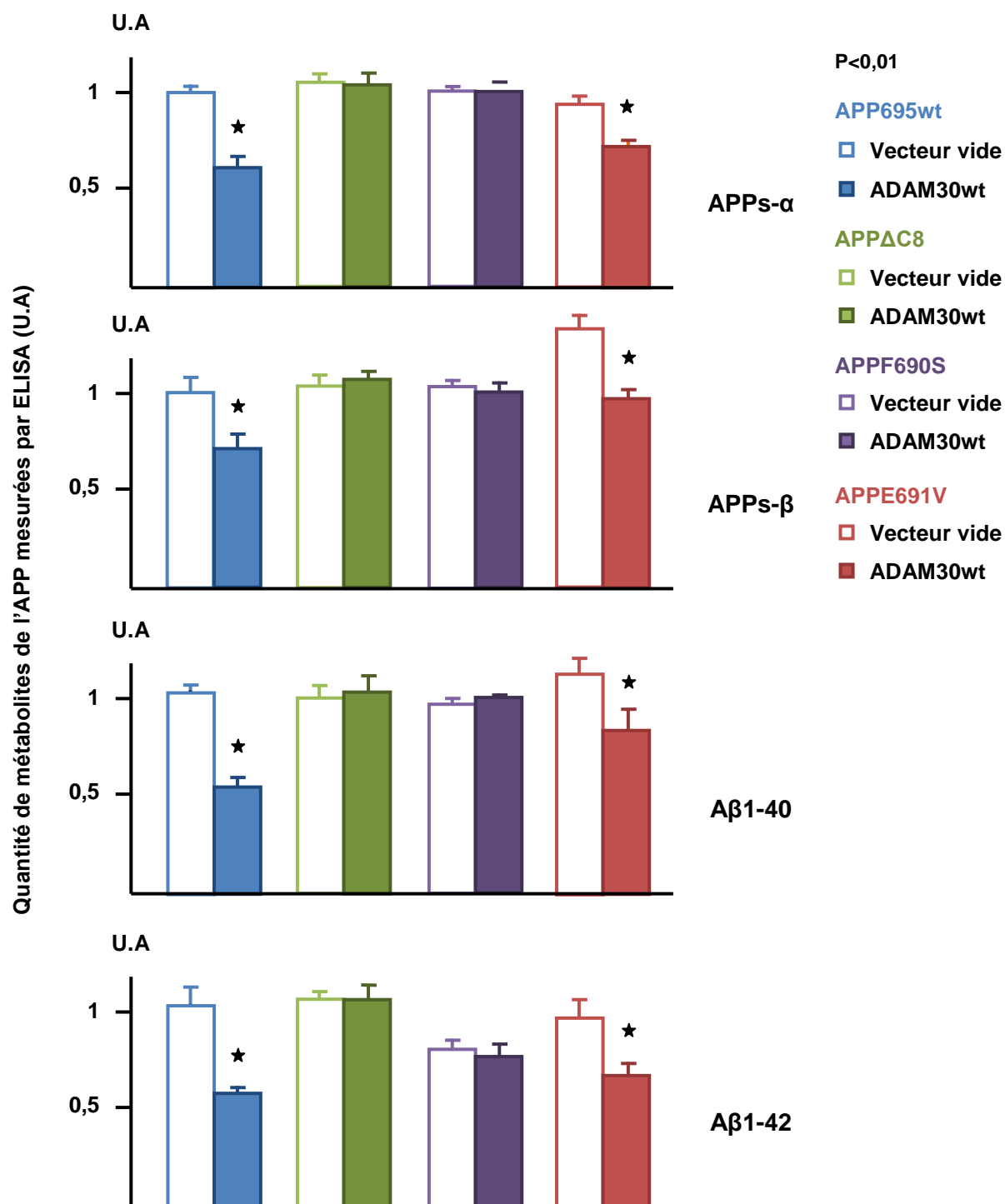


Figure 55. L'impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP nécessite le signal d'adressage au lysosome de l'APP. Mesure par ELISAs de l'impact de la sur-expression d'ADAM30 dans des cellules HEK293 surexprimant un APP^{695wt}, un APPΔC8, un APP^{F690S} (APP^{695wt} dont le signal d'adressage au lysosome a été muté) ou un APP^{E691V} (APP^{695wt} dont un acide aminé proche du signal d'adressage au lysosome mais pas dans sa séquence, a été muté). Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes. Test statistique: test student.

5. Premiers travaux de caractérisation d'IRS4 comme autre substrat d'ADAM30

Cette partie traitera essentiellement de travaux en cours de réalisation et ne sont donc pas soumis pour l'instant à publication.

5.A. Sur-expression d'IRS4 et modulation du métabolisme de l'APP

Pour comprendre la relation potentielle entre IRS4, ADAM30 et le métabolisme de l'APP, nous avons dans un premier temps surexprimé un IRS4 humain dans nos cellules HEK293-APP^{695wt} (Fig.56). Nous avons pu observer que la sur-expression d'IRS4 entraîne une augmentation de production de tous les produits du métabolisme de l'APP comparé aux cellules surexprimant un vecteur vide et ceci sans pour autant moduler la quantité d'holo-APP (Fig.56). Nous avons alors réalisé une double mutation du site de coupure potentiel d'ADAM30 sur IRS4 obtenu par la technique COFRADIC-SILAC (voir chapitre 2.B.). Cette mutation ne se situe pas dans les régions d'interaction spécifique d'IRS4 avec ces substrats comme Grb2 ou la PI3K (Fig.38). Nous avons alors surexprimé cet IRS4^{mut} dans nos cellules HEK293-APP^{695wt}. Comme précédemment avec la sur-expression d'IRS4^{wt}, nous avons pu constater une augmentation de production de tous les produits du métabolisme de l'APP comparé aux cellules surexprimant un vecteur vide (Fig.56). La mutation apportée à IRS4 ne semblerait donc pas modifier l'action d'IRS4 sur le métabolisme de l'APP. Dans un second temps, nous avons réalisé des co-sur-expression d'IRS4^{wt} ou d'IRS4^{mut} avec ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut}. Comme attendu, les cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant ADAM30^{wt} présentent bien une diminution de la quantité de tous les métabolites de l'APP et la sur-expression d'ADAM30^{mut} n'entraîne pas cette diminution puisque le domaine catalytique d'ADAM30 est inactif (Fig.56). Comme constaté précédemment, la sur-expression d'IRS4^{wt} ou d'IRS4^{mut} seule conduit à une augmentation de la production de tous les produits du métabolisme de l'APP (Fig.56). Nous avons pu observer que la co-sur-expression d'IRS4^{wt} et d'ADAM30^{wt} entraîne une augmentation de la production de tous les produits du métabolisme de l'APP par rapport aux quantités observées dans les cellules surexprimant un vecteur vide mais

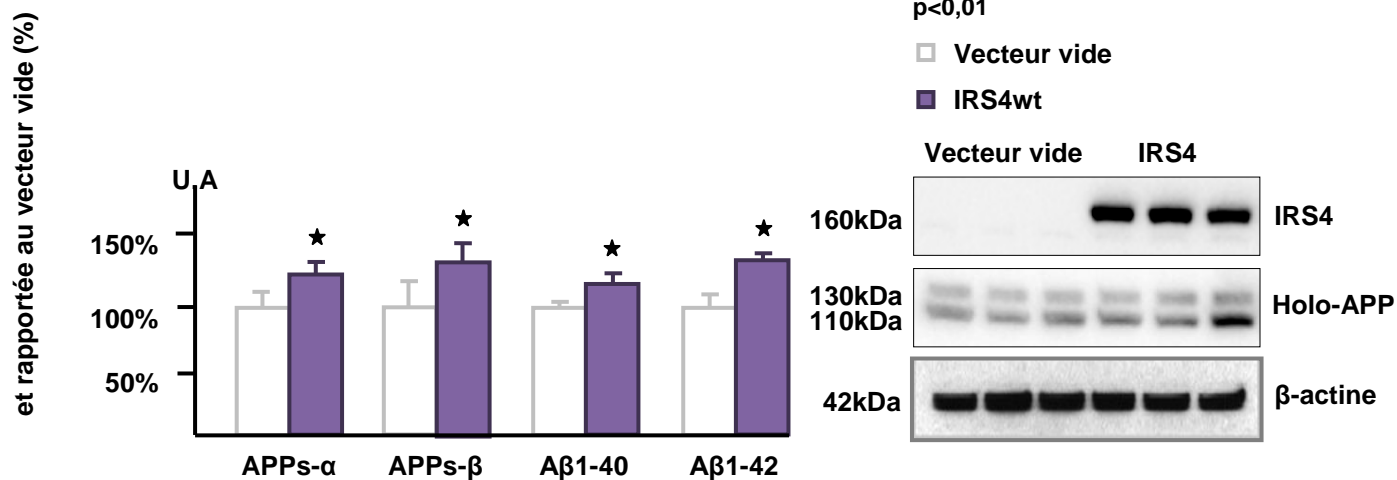


Figure 56. Mesure par ELISAs et WB de l'impact de la sur-expression d'IRS4 sur le métabolisme de l'APP dans les cellules HEK293-APP^{695wt}. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes. Test statistique: test student.

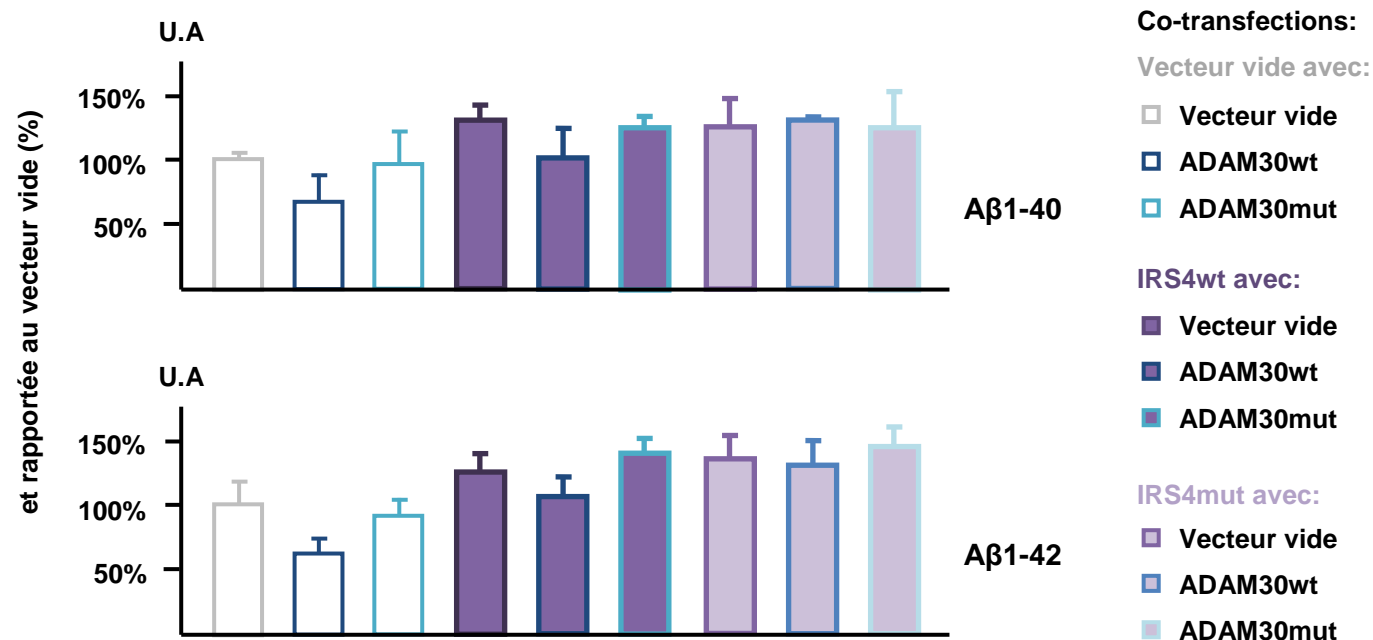


Figure 57. Mesure par ELISAs de l'impact de la surexpression d'ADAM30^{wt/mut} seule (en blanc), de la sur-expression d'IRS4^{wt} avec celle d'ADAM30^{wt/mut} (en violet foncé) ou encore de la sur-expression d'IRS^{mut} avec celle d'ADAM30^{wt/mut} (en violet clair) sur le métabolisme de l'APP dans les cellules HEK293-APP^{695wt}. Ces expériences n'ont pour l'instant été réalisées qu'une seule fois et uniquement sur les Aβ.

en quantité moindre que les cellules ne surexprimant que IRS4^{wt}. La co-sur-expression d'IRS4^{wt} avec ADAM30^{mut} au lieu d'ADAM30^{wt} conduit à la même quantité de métabolites de l'APP mesurés que chez les cellules surexprimant un IRS4^{wt} seulement (Fig.56). Enfin, la mutation d'IRS4 et sa co-sur-expression avec ADAM30^{wt} entraîne une augmentation de la quantité de tous les produits du métabolisme de l'APP à des niveaux équivalents de ceux obtenus dans nos cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant seulement IRS4^{wt} (Fig.56). Grâce à ces résultats préliminaires obtenus, IRS4 semblerait augmenter le métabolisme de l'APP et ADAM30 limiterait cet effet sans pour autant l'annuler. ADAM30 et IRS4 pourraient alors avoir un rôle antagoniste sur le métabolisme de l'APP.

5.B. Localisation d'IRS4

Les observations obtenues précédemment montrent qu'IRS4 semble avoir un impact sur le métabolisme de l'APP et ceci indépendamment d'ADAM30. Nous avons alors réalisé des immunofluorescences et PLA entre IRS4^{wt} ou IRS4^{mut} et l'APP^{695wt}. Après sur-expression d'IRS4^{wt} dans nos cellules HEK293-APP^{695wt}, nous avons constaté une colocalisation entre IRS4 et l'APP en immunofluorescence et en PLA (Fig.58). Cette colocalisation qui indique simplement une proximité importante des deux protéines (pas nécessairement une interaction physique) est retrouvée lorsque IRS4^{mut} est surexprimé à la place d'IRS4^{wt}. Il semblerait donc que la mutation de la séquence de coupure potentielle d'ADAM30 sur IRS4 ne modifie pas sa localisation ni la colocalisation avec l'APP. IRS4 est une protéine appartenant à la voie de signalisation du récepteur à l'insuline. Elle sert essentiellement de relais phosphoprotéique entre le récepteur à l'insuline et les autres protéines transductrices du signal dont Grb2 et la PI3K (Fig.38) (Lavan *et al.* 1997, Fantin *et al.* 1999, Uchida *et al.* 2000, Cai *et al.* 2003). Suivant ces informations, nous avons supposé qu'IRS4 pouvait moduler le métabolisme de l'APP en activant un de ses substrats. Il est notamment indiqué dans la littérature que l'APP est capable d'interagir avec Grb2 (Nizzari *et al.* 2007). Nous avons réalisé des immunofluorescences et PLAs sur nos cellules HEK293 co-surexprimant IRS4^{wt} et l'APP Δ C8, l'APP^{F690S} ou l'APP^{E691V} pour déterminer si la partie C-terminale de l'APP est indispensable pour l'effet d'IRS4. Suite à la sur-expression de l'APP Δ C8 et d'IRS4^{wt}, les cellules HEK293 présentent

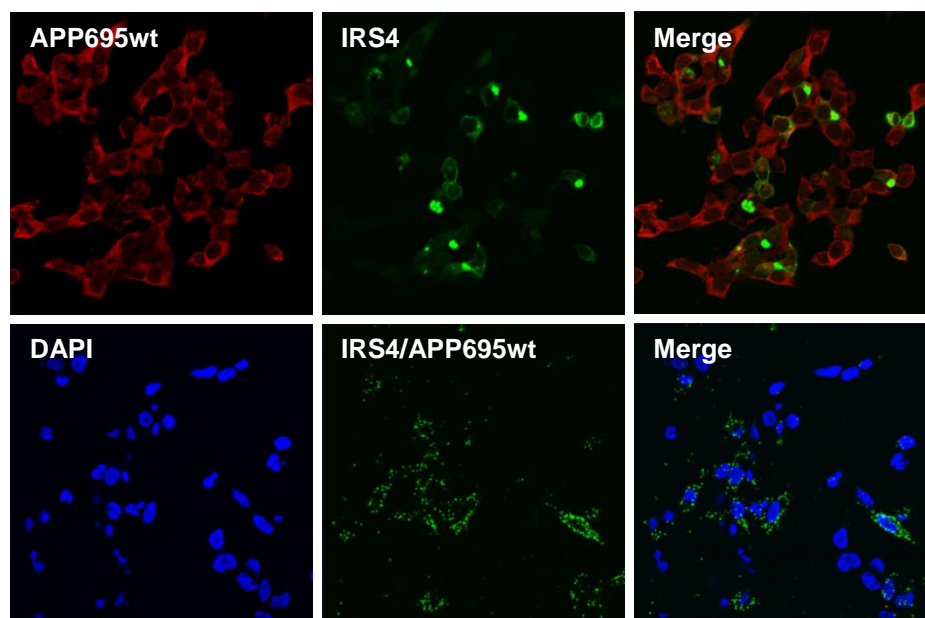


Figure 58. Observation par Immunofluorescences et PLAs d'IRS4 et de l'APP^{695wt} dans les cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant IRS4. Les cellules n'ont pas été transfectées, les immunofluorescences d'IRS4 correspondent à la protéine endogène, celles de l'APP correspondent à la surexpression stable de l'APP dans cette lignée cellulaire. Pour le merge, les cellules ont été traitées au DAPI afin de visualiser les noyaux. Puis les fluorescences de l'APP et d'IRS4 ont été superposées à la coloration au DAPI pour visualiser une potentielle colocalisation. Les spots de fluorescences verts obtenus pour la technique du PLA correspondent à une proximité très importante entre IRS4 et l'APP. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes.

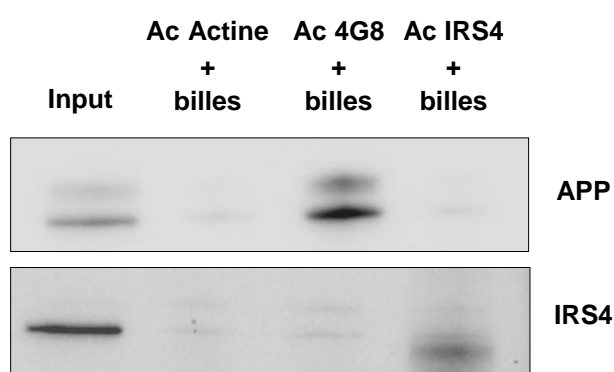


Figure 59. Immunoprécipitation d'IRS4 et de l'APP à partir des cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant IRS4. Le western blot du haut correspond aux protéines immunoprécipitées avec l'anticorps ciblant l'APP (4G8) ou celui ciblant IRS4 et révélées avec l'anticorps ciblant l'APP (4G8). Celui du bas est réalisé sur les mêmes précipitats mais révélé en utilisant l'anticorps ciblant l'IRS4 cette fois. L'input correspond à l'extrait cellulaire sans immunoprécipitation (billes présentent mais sans anticorps). Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et est en cours de réplication.

moins de colocalisation que ce que nous avons pu observer chez les cellules surexprimant l'IRS4^{wt} et l'APP^{695wt} (Fig.60). En revanche, ni la sur-expression de l'APP^{F690S} ou de l'APP^{E691V} ne modifie le paterne de colocalisation entre IRS4 et l'APP (Fig.60). Bien que les huit derniers acides aminés de la partie C-terminale de l'APP puissent être nécessaires pour l'effet d'IRS4 sur le métabolisme de l'APP, il semblerait que cet effet ne soit pas directement lié à une séquence consensus spécifique localisée dans cette partie. En amont de la coupure ΔC8, il existe une séquence sur l'APP indispensable pour son internalisation, la séquence Y₆₈₂ENPTY₆₈₇ (Fig.53). La Tyrosine 682 de ce motif est un site de phosphorylation de l'APP décrit dans la littérature. Nous avons réalisé une mutation de cette Tyrosine en Alanine pour vérifier si cet acide aminé pouvait être le site de phosphorylation par IRS4 ou un de ces substrats. Bien que les résultats liés à ces travaux soient en cours de répllication, il semblerait que la colocalisation entre IRS4 et l'APP soit diminuée lorsque l'APP^{Y682A} est surexprimé, comparé aux cellules surexprimant l'APP^{695wt} (Fig.60).

Enfin nous avons pu réaliser des Immunoprécipitations de l'APP⁶⁹⁵ et d'IRS4 dans les deux sens pour déterminer s'il existe une interaction physique entre ces deux protéines. En réalisant l'immunoprécipitation de l'APP^{695wt}, nous avons pu obtenir par Western Blot une bande de 160kDa correspondant au poids moléculaire de l'IRS4 (Fig.59). Cependant, en réalisant l'immunoprécipitation d'IRS4, nous n'avons pas pu obtenir de bande correspondant à l'APP^{695wt} (Fig.59). Bien que ces résultats soient toujours en cours, il semblerait qu'IRS4 et l'APP interagissent bien ensemble comme l'indiquent les différentes immunofluorescences et immunoprécipitations de l'APP mais l'immunoprécipitation d'IRS4 nous indique aussi que cette interaction pourrait être indirecte et faire appel à une protéine intermédiaire comme Grb2 ou la PI3K.

Nous travaillons également actuellement sur la localisation d'IRS4 et d'ADAM30, mais nous n'avons pas pour l'instant pu montrer une colocalisation entre ces deux protéines. Il est possible que l'interaction soit suffisamment courte pour que nous ne puissions pas l'observer via nos techniques employées.

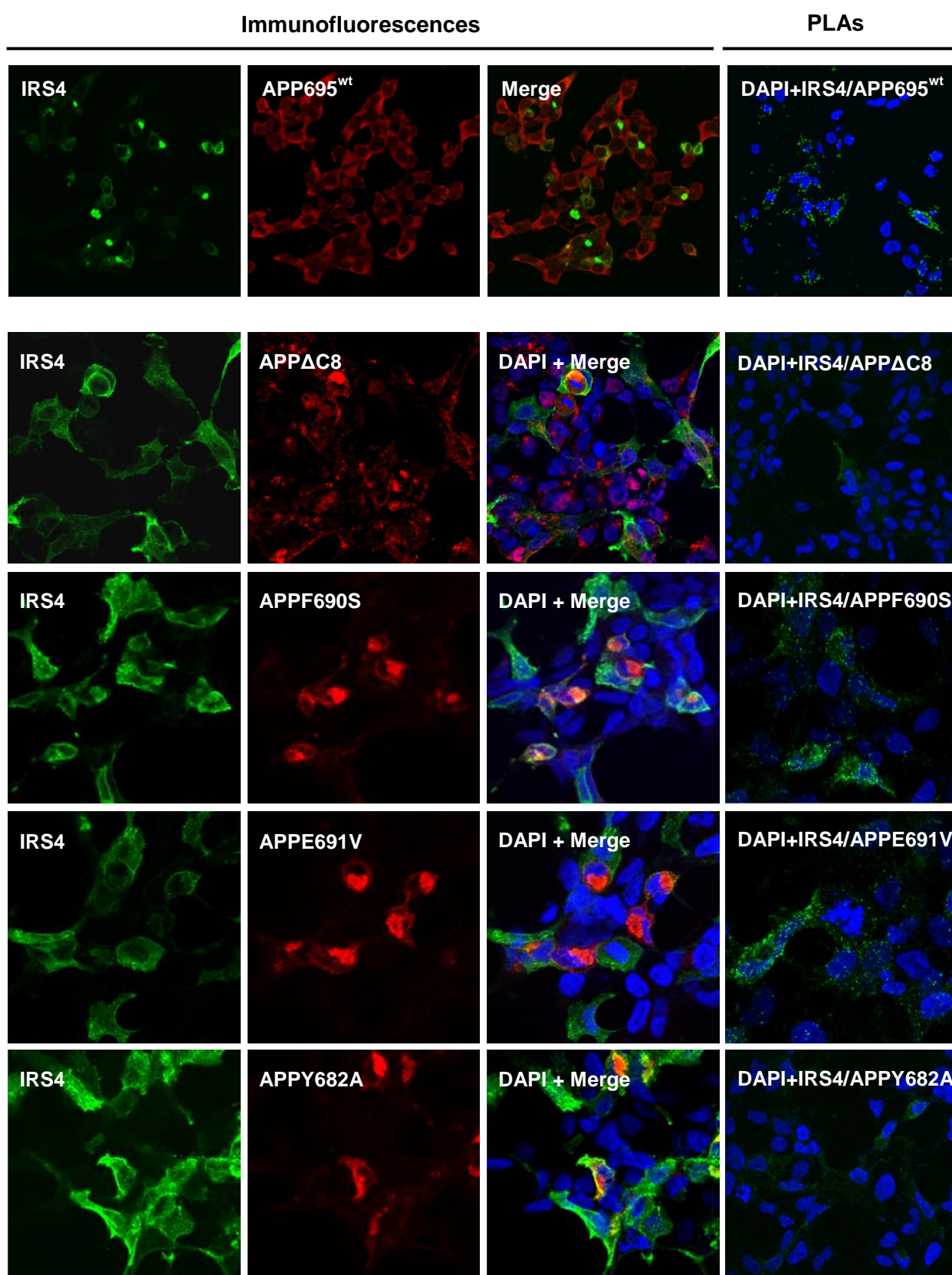


Figure 60. Observation par immunofluorescence et PLAs d'IRS4 et de l'APP695^{wt}, APPΔC8, APP^{F690S}, APP^{E691V} ou APP^{Y682A} dans les cellules HEK293 surexprimant l'APP695^{wt}, APPΔC8, APP^{F690S}, APP^{E691V} ou APP^{Y682A}. Les immunofluorescences d'IRS4 correspondent à la protéine endogène. Pour le merge, les cellules ont été traitées au DAPI afin de visualiser les noyaux. Puis les fluorescences des APPs et d'IRS4 ont été superposées à la coloration au DAPI pour visualiser une potentielle colocalisation. Les spots de fluorescences verts obtenus pour la technique du PLA correspondent à une proximité très importante entre IRS4 et les différents APPs. Expériences réalisées 3 fois de manière indépendantes.

Discussion et perspectives

1. Identification d'un nouvel acteur dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie très largement étudiée mais son émergence ainsi que les processus physiopathologiques aboutissant à cette pathologie restent encore à déterminer précisément. Bien que nous connaissions l'importance du métabolisme de l'APP et celle de la régulation l'état de phosphorylation de la protéine Tau, une bataille d'experts se joue sur l'implication et l'intrication de ces deux métabolismes. De plus, d'autres mécanismes comme l'inflammation ou l'insulinorésistance cérébrale semblent influencer ou être directement impliqués dans cette pathologie. C'est pourquoi opter pour des approches multidisciplinaires devrait permettre de mettre en évidence de nouveaux acteurs de ses métabolismes et ainsi mieux identifier leurs interactions.

L'utilisation de ses approches multidisciplinaires a permis à notre laboratoire d'identifier une nouvelle protéine potentiellement impliquée dans le métabolisme de l'APP et sa régulation. Notre approche originale a consisté en l'analyse transcriptomique de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de ceux provenant de patients sains. Cette approche sans a priori mais focalisée sur la famille des ADAMs et MMPs a permis de mettre en avant quatre ADAMs potentiellement impliquées et seule l'expression d'ADAM30 s'est révélée significativement corrélée à la pathologie Alzheimer ([Fig.22](#)).

ADAM30 est une métalloprotéase initialement identifiée et clonée en 1999 à partir du tissu testiculaire humain ([Cerreti et al. 1999](#)). Depuis, peu de travaux ont été effectués sur ADAM30 comme en témoigne les 4 publications disponibles seulement, toutes basées sur des études d'associations génétiques ([Hu et al. 2009](#), [Gupta et al. 2012](#), [Ho et al. 2013](#), [Almawi et al. 2013](#)). Si la plupart des ADAMs sont ploy-exoniques (16 pour ADAM10, 19 pour ADAM17 et 23 pour ADAM33) le gène d'ADAM30 est mono-exonique. La seule autre ADAM partageant cette particularité est ADAM1. Ces deux protéines ont été localisées au niveau du testicule où ADAM1 joue un rôle important dans la fertilité. ADAM30 est localisé au niveau du chromosome 1q12 à proximité du gène NOTCH2.

Comme ADAM10 et ADAM17, la protéine ADAM30 est caractérisée par la présence d'un domaine catalytique dont l'activité enzymatique est dépendante de la présence d'un ion zinc, et d'un domaine d'interaction avec les intégrines en partie N-

terminale (Fig.20 et 21) (Cerreti *et al.* 1999). Du fait de sa localisation au niveau des vésicules cellulaires, ADAM30 devrait présenter son domaine catalytique dans la lumière de ces vésicules. Ce domaine catalytique est capital pour l'activité de nombreuses ADAMs. Celui-ci est initialement bloqué par le prodomaine (Fig.20). Ce prodomaine existe chez de nombreuses protéines comme la CTSD et empêche une dégradation prématurée de la protéine avant sa maturation totale. Chez les plupart des ADAMs comme ADAM10 et ADAM17, le prodomaine est clivé et séparé de la protéine (Howard *et al.* 2000, Schlomann *et al.* 2002, Gonzales *et al.* 2004). Si le prodomaine est clivé chez ADAM30, il semblerait que celui-ci ne soit pas séparé mais reste accroché à la protéinase ce que nous avons pu constater par Western Blot (Une seule forme d'ADAM30 est observable contre deux pour ADAM10, la forme pro et la forme mature). Cette particularité est aussi retrouvée chez d'autres ADAMs comme ADAM12 (Wewer *et al.* 2006).

Toutes les ADAMs sont des protéines transmembranaires de type I. Si de nombreuses ADAMs comme ADAM9, ADAM10, ADAM17 ou encore ADAM33 sont localisées à la membrane plasmique, nous avons pu déterminer qu'ADAM30 a une localisation uniquement intracellulaire et plus précisément au niveau de la membrane de l'endosome tardif et du lysosome. Les premières expériences réalisées sur nos modèles cellulaires sur le métabolisme de l'APP ont montré que la sur-expression d'ADAM30 conduit à une diminution de production de tous les produits du métabolisme de l'APP incluant les APP sécrétés α et β ainsi que les $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ (Fig.24). Seule la quantité de holo-APP (protéine complète) ne semble pas diminuée par la sur-expression d'ADAM30. A l'inverse, l'utilisation d'un sh-ARN contre ADAM30 induisant sa sous expression, provoque une augmentation de production de tous les métabolites de l'APP, sauf de l'APP lui-même (Fig.23). Enfin, contrairement à ADAM10, ADAM30 ne semble pas cliver directement l'APP. Ces résultats et la localisation particulière d'ADAM30 nous ont permis d'exclure cette ADAM comme α -sécrétase potentielle de l'APP comme le sont ADAM9, ADAM10 et ADAM17.

Dans un second temps, nous avons émis l'hypothèse d'une action directe d'ADAM30 en tant que protéase sur les différentes sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP expliquant ainsi la diminution de production globale observée sans variation du pool d'holo-APP. Les expériences menées en collaboration avec le

laboratoire CNRS UMR 7275 de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de Nice dans le cadre du Laboratoire d'Excellence Distalz ont permis d'écarter cette hypothèse initiale et notre laboratoire a également écarté l'APP comme substrat d'ADAM30 (Fig.36 et 37).

2. Expression et étude de l'impact d'ADAM30 dans un modèle *in vivo*

Suite aux résultats obtenus chez l'Homme et dans nos modèles cellulaires et afin de mieux comprendre l'importance de l'effet d'ADAM30, nous avons choisi d'étudier l'impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP *in vivo* dans un modèle murin. Bien que les modèles animaux soient plus contraignants et plus longs à mettre en place que les modèles cellulaires, ceux-ci offrent plusieurs avantages comme par exemple, l'étude d'un processus physiopathologique à court moyen et long terme ou la caractérisation physiologique et comportementale de cet effet.

2.A. Choix du modèle expérimental

La mise en place d'un modèle animal requière plusieurs choix importants. Ainsi, si de nombreux modèles existent, aucun ne reproduit exactement la pathologie Alzheimer. Ceci provient d'une part du fait que le champ de connaissances sur le pourquoi et le développement de la pathologie reste encore incomplet, et d'autre part que les modèles animaux, souvent murins, limitent nécessairement l'étude comportementale mais aussi la reproductibilité chez l'humain (Hall et al. 2012, LaFerla et al. 2012). C'est pourquoi bien souvent il est choisi une facette de la pathologie, dans notre cas le métabolisme de l'APP.

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, deux grandes écoles se distinguent quant aux modèles murins. La première est constituée des modèles basés sur l'injection intracérébrale de protéines purifiées comme les A β , ou de vecteurs viraux permettant l'expression accélérée et ciblée de ces protéines. Dans la deuxième sont retrouvés les modèles transgéniques. Ces modèles mono ou multi-transgéniques permettent l'expression contrôlée ou non d'un ou plusieurs gènes durant le développement et le vieillissement de l'animal. Ainsi, chaque école a ses avantages

et ses inconvénients. Les modèles par injection ont l'avantage de la rapidité, de la localisation très précise, de la reproductibilité et de la « force » de l'impact de la protéine injectée. Cependant, outre une chirurgie lourde, ils génèrent une inflammation et donc une réponse immunitaire réactionnelle à l'injection, indépendamment du produit injecté. De plus, la maladie d'Alzheimer est une pathologie très progressive qui ne correspond donc pas à la rapidité d'une injection intracérébrale. Les modèles transgéniques quant à eux offrent l'avantage d'une expression plus « physiopathologique » puisque le gène et donc la protéine sont exprimés aux cours du développement et/ou du vieillissement de l'animal entraînant une apparition progressive des effets ou des symptômes. Par exemple, l'APP peut être exprimé en évitant les phases critiques du développement cérébral et permettre de mesurer son impact au bout de 10 mois de vieillissement ce qui correspond globalement à l'âge d'apparition de la maladie d'Alzheimer chez l'Homme. De plus, la protéine ainsi exprimée va être produite sur le long terme et ainsi permettre de caractériser son impact sur les métabolismes, la physiologie et le comportement au cours de la vie de l'animal. Un autre avantage important de ces modèles est la capacité de contrôler l'expression du gène d'intérêt qu'elle soit spatiale (pour une expression uniquement dans l'hippocampe par exemple) ou temporelle (Par exemple n'exprimer le gène qu'à partir de la naissance pour ainsi éviter des phases critiques du développement, ou éteindre un gène précis à un moment donné). Cependant, le nombre d'animaux nécessaire pour les croisements augmente fortement entre un modèle double transgénique et un modèle quintuple transgénique par exemple. De plus, le risque de dilution des fonds génétiques ou la diminution du nombre de copies du gène exprimé sont fortement dépendants du nombre de générations d'animaux effectuées et conduit souvent à une forte variabilité dans les résultats obtenus. Enfin, notons que dans les deux cas de figures, les dernières lois de Bioéthique rendent impérative l'application de la règle dite « des trois R », réduire, raffiner, remplacer. Ainsi un modèle animal, qu'il soit murin ou autre, nécessite d'utiliser le moins d'animaux possible et d'ajuster son modèle en fonction de la ou les questions posées tout en évitant les protocoles douloureux.

Pour notre étude nous avons fait le choix d'un modèle de souris triple transgénique exprimant d'une part un APP double mutant (deux mutations humaines la Swedish et l'Indiana) et d'autre part ADAM30 (sauvage ou mutée) dont

l'expression temporo-spatiale est sous contrôle d'un système Cre/LoxP et donc de la CamKII α . Il n'existe que 60% d'homologies entre l'ADAM30 souris et l'ADAM30 humain et nous avons pu constater dans l'Allen Brain Atlas (www.brain-map.org) et sur Molecular Brain (www.molecularbrain.com) que l'expression d'ADAM30 n'est pas retrouvée de manière endogène dans le cerveau des souris mais est bien présente chez l'humain. C'est pourquoi, bien qu'une sous-expression d'ADAM30 via un modèle KO aurait pu être logique étant donné que les patients atteints de maladie d'Alzheimer présentent une diminution d'expression d'ADAM30, nous avons opté pour un modèle de sur-expression contrôlée d'ADAM30. De cette manière nous avons humanisé notre modèle de souris.

2.A.1. Choix de la souris APP695^{SweInd}

Ce modèle de souris C57bl/6J est sous contrôle du promoteur PDGF- β qui permet une forte expression de l'APP695 spécifique aux neurones du néocortex et plus particulièrement de l'hippocampe ([Mattson et al. 1997](#)). Ce modèle de souris, très couramment utilisé pour l'étude de la pathologie amyloïde, porte deux mutations issues des formes familiales de la maladie d'Alzheimer : la mutation Swedish et la mutation Indiana. L'expression de cet APP^{SweInd} humain conduit à une apparition plus rapide des dépôts amyloïdes que chez les souris exprimant un APP695^{Swe} (ex : Tg2576) ou un APP695^{Ind}. Ainsi en histologie, on observe à partir de 5 à 7 mois des dépôts diffus de peptides amyloïdes et à partir de 8 à 10 mois des plaques d'A β sont présentes accompagnées d'une dystrophie neuronale dans leur périphérie directe ([Mucke et al. 2000](#)). D'un point de vue comportemental, à partir de 4 à 7 mois, les souris PDGF-APP695^{SweInd} ont besoin de plus de temps que les souris WT pour retrouver la plate-forme immergée lors du test de la Piscine de Morris ([Mucke et al. 2000](#)).

Nous avons pu constater que bien que nos différentes lignées de souris ne semblent pas présenter de différences significatives de poids, il semblerait que les lignées de souris surexprimant l'APP présentent une glycémie plus basse que les lignées de souris n'exprimant pas l'APP^{SweInd} ([Fig.30](#)). Ces travaux préliminaires sont pour l'instant difficiles à interpréter. En effet, la littérature nous informe que beaucoup de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent une insulino résistance

cérébrale (Craft et al. 2007). Or il a été démontré par des analyses post-mortem et dans des modèles animaux que le métabolisme de l'insuline est perturbé et qu'il est constaté des niveaux d'insuline et de récepteurs à l'insuline plus faibles dans les cerveaux des cas Alzheimer (Steen et al. 2005, Lester-Coll et al. 2006, Moloney et al. 2010).

2.A.2. Lignées CamKII α /Cre, ADAM30^{wt/mut} et choix du système Cre/LoxP

Du fait du rôle majeur de certaines ADAMs et comme ADAM30 fût initialement localisée au niveau des testicules (Cerreti et al. 1999), nous avons supposé qu'une sur-expression d'ADAM30 durant le développement pouvait potentiellement engendrer des problèmes au niveau de la fertilité des animaux voire même être potentiellement létale. Pour contourner ce problème, nous avons choisi d'éviter les phases importantes du développement ante et post-natal par une expression d'ADAM30 localisée uniquement au niveau du cerveau (principalement au niveau de l'hippocampe) et ce à partir du 14^e jour post-natal (évite la phase critique pour la fertilité). Pour cela nous avons choisi un système Cre/LoxP sous contrôle du promoteur CamKII α . Ce promoteur permet une expression du gène cible au niveau de l'Hippocampe majoritairement mais aussi dans le cortex et le striatum (Burgin et al. 1990, Minichiello et al. 1999). Ce système, expliqué en détail dans la section matériel et méthodes 4.A., nécessite deux lignées : l'une possédant la construction contenant le gène ADAM30 précédé d'un codon STOP cerné par deux sites LoxP et l'autre exprimant le gène Cre sous contrôle du promoteur CamKII α (Fig.28). Par croisement des deux lignées, la descendance possédant les deux constructions va exprimer au niveau du cerveau le gène Cre. Cette Cre va alors provoquer la recombinaison des deux sites LoxP autour du codon STOP permettant son excision. L'expression d'ADAM30 est alors possible sous contrôle de son promoteur GAG. Le problème de ces deux lignées provient essentiellement du fait qu'elles ne sont pas dans le même fond génétique : les souris CamKII α /Cre sont dans un fond C57bl/6J et les souris ADAM sont dans un fond C57bl/6N (Fig.29). Pour éviter une trop forte dilution de nos fonds génétiques qui pourrait ajouter des variations non désirables dans nos tests, nous avons dans un premier temps croisé les souris PDGF-APP695^{SweInd} avec les souris CamKII α /Cre. La descendance APP^{SweInd}-Cre a alors été croisée à son tour avec les souris ADAM30. Nous avons alors travaillé en F1 sur des souris hétérozygotes afin d'obtenir l'ensemble des génotypes possibles dans la

descendance. D'un point de vue métabolique, nous avons pu constater que les lignées de souris exprimant ADAM30^{wt} semblent présenter une glycémie plus élevée que les lignées de souris surexprimant l'ADAM30^{mut} (Fig.30). Bien que ces résultats soient préliminaires, nous pouvons supposer qu'ADAM30 puisse intervenir de façon indirecte sur le métabolisme de glucidique (potentiellement par la voie d'IRS4) et que la sur-expression d'ADAM30^{wt} puisse altérer le métabolisme normal du glucose et provoquer une moins bonne réponse au test de glycémie que nous avons pu constater. Cette hypothèse pourrait être en partie soutenue par l'implication d'ADAM30 dans une GWAs effectuée sur le diabète de type II (Ho *et al.* 2013).

2.B. Impact d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP *in vivo*

Nous avons pu constater dans notre modèle de souris triple transgéniques que l'expression d'ADAM30^{wt} entraîne une diminution notable de la concentration de dépôts amyloïdes au niveau de l'hippocampe et du cortex des souris (Fig.33, 34 et 35). Au contraire, cette diminution de concentration de dépôts amyloïdes n'a pas été constatée chez les souris exprimant ADAM30^{mut}. Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus précédemment dans nos modèles cellulaires mais aussi chez l'Homme, renforçant ainsi l'importance d'ADAM30 pour la régulation du métabolisme de l'APP et notre hypothèse initiale. Aussi, nous avons pu constater comme chez l'humain une visible diminution des dépôts amyloïdes chez les souris exprimant ADAM30^{wt} mais pas chez les souris exprimant ADAM30^{mut}. Ces derniers résultats ont été générés dans un modèle cérébral en 3D réalisé en collaboration avec le laboratoire CEA de l'I2BM du MIRCen de Fontenay aux Roses (Fig.34 et 35). Outre la possibilité d'avoir un aperçu de la spatialisation des dépôts amyloïdes dans le cerveau des souris et en particulier dans l'hippocampe, le modèle 3D permet d'être plus précis que l'immunohistologie classique bidimensionnelle. En effet, l'immunohistologie est réalisée généralement sur 5 à 10 coupes de cerveau prises aléatoirement. A partir de ces coupes une quantification est réalisée avec extrapolation sur la quantité de dépôts amyloïdes attendue dans le cerveau total ou la zone étudiée. Cependant, ces coupes ne représentent au final qu'une portion infime du cerveau de l'animal et donc il est possible de surestimer ou sous-estimer la quantité de dépôts dans le cerveau de l'animal en raison d'une variation

d'échantillonnage, biais connu en statistique. A l'inverse, le modèle 3D est basé sur des centaines de coupes permettant ainsi d'une part d'affiner l'estimation de la quantité de dépôts amyloïdes observés et d'autre part de générer une représentation 3D de la spatialisation des dépôts amyloïdes. C'est pourquoi nous avons opté pour un modèle 3D plutôt que des expériences d'immunohistologies 2D classiques.

Nous avons pu déterminer dans nos lignées HEK293-APP^{695wt} surexprimant ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} qu'ADAM30 ne modulait pas l'activité des sécrétases. Nous avons pu vérifier ce résultat par RT-qPCR chez nos souris et avons constaté un résultat similaire (Fig.32). Seules les lignées surexprimant l'APP695^{SweInd} présentent une augmentation de l'expression de BACE1 comme attendu. Ces résultats nous ont donc permis de confirmer le rôle régulateur d'ADAM30 pour le métabolisme de l'APP mais aussi que cet effet ne passe pas par une régulation des sécrétases. Bien que nous ayons montré précédemment qu'ADAM30 n'était pas localisée au niveau de la membrane cellulaire, nous avons supposé qu'ADAM30 pouvait directement faciliter la dégradation de l'APP avant son entrée dans les voies amyloïdogène et non-amyloïdogène à la surface de la cellule. Cependant, nous avons pu constater que la sur-expression d'ADAM30^{wt/mut} ne modifiait pas le profil d'internalisation de l'APP (Fig.37). C'est pourquoi nous avons également cherché quels étaient les intermédiaires entre ADAM30 et le métabolisme de l'APP et donc quels pouvaient être les substrats d'ADAM30.

3. CTSD et IRS4 : substrats d'ADAM30 et acteurs du métabolisme de l'APP

Pour déterminer les substrats d'une protéine, plusieurs techniques existent et nous avons choisi celle qui maximise nos chances d'identifier un substrat d'ADAM30 spécifique à son action sur le métabolisme de l'APP et ce sans a priori. Les techniques classiques d'immunoprécipitation et d'identification auraient été trop longues sachant qu'aucune donnée n'est disponible quant à un éventuel substrat et celui-ci pourrait être indépendant du métabolisme de l'APP. Une autre solution aurait été la comparaison directe des deux spectres protéiques bidimensionnels issus de la culture des deux lignées de cellules HEK293-APP^{695wt}, l'une surexprimant ADAM30^{wt} et l'autre surexprimant ADAM30^{mut}. Nous avons opté pour une troisième solution en collaboration avec le laboratoire du VIB de Gand qui consiste en une technique de N-

terminomique appelée COFRADIC-SILAC, détaillée dans la section matériel et méthodes 1.A. Cette technique présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques plus classiques : 1) les cellules sont cultivées et synchronisées permettant ainsi d'assurer un minimum de biais lié à un différentiel de croissance entre les lignées, 2) les lysats des cellules sont mélangés permettant une comparaison des deux lignées sur la même analyse de spectre, 3) les substrats ainsi obtenus ont beaucoup plus de chance d'être liés (de près ou de loin) au métabolisme de l'APP. Nous avons pu ainsi identifier 18 substrats potentiels incluant la CTSD et l'IRS4. Ce faible nombre de candidats pourrait être lié à certains aspects de la procédure expérimentale comme par exemple le nombre relativement restreint de protéines initialement détectées (2238) ou la dégradation rapide de certains fragments protéiques. Parmi les autres candidats potentiels, sont retrouvées un grand nombre de protéines ribosomales et protéines du cycle cellulaire (Tab.6). Bien que ces protéines puissent être des substrats potentiel d'ADAM30, il est probable qu'elles proviennent d'un biais inhérent à l'expérience et il est courant lors de l'utilisation de cette approche d'obtenir un grand nombre de ces protéines. En effet, même si les deux cultures de cellules sont synchronisées, les différences de croissance, de cycle et/ou de mort cellulaire engendrent nécessairement une sur/sous représentation de ces protéines lors d'une telle approche.

3.A. La CTSD, protéase lysosomale et actrice du métabolisme de l'APP

La CTSD participe à la dégradation et donc à la clairance de l'APP au sein du lysosome sans générer de peptide amyloïde (Malik et al. 2011). C'est pourquoi nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur la CTSD. Certaines études montrent que la Cathepsine D participerait au métabolisme de l'APP en clivant celui-ci permettant ainsi la libération du peptide amyloïde (Sadik et al. 1999, Nixon et al. 2000). Aussi, bien que la CTSD participe au métabolisme de l'APP sans faire partie de ses sécrétases (Saftig et al. 1996) de nouvelles études tendent à présenter la cathepsine D comme potentielle nouvelle β -sécrétase de l'APP (Evin et al. 1999, Grüniger-Leitch et al. 2000). La CTSD est une aspartyl-protéase localisée au niveau de la voie endosome/lysosome et nécessite un clivage sur un site spécifique d'endoprotéolyse permettant ainsi la libération de deux chaînes constituant la CTSD

mature inactive qui se dimérisent et forment la CTSD mature active (Fig.39) (Fusek *et al.* 2005). De façon intéressante, nous avons pu observer que le site théorique de coupure d'ADAM30 sur la CTSD, obtenu par la méthode COFRADIC-SILAC, correspond au site d'endoprotéolyse nécessaire à l'activation de la CTSD (Fig.40). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'activité *in vitro* de la CTSD humaine recombinante en présence ou non d'ADAM30^{wt/mut} humaine recombinante. Nous avons pu constater que l'activité de la CTSD augmente fortement en présence d'ADAM30^{wt} (Fig.41). Nous avons réitéré cette expérience sur les lysats de nos cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut}. Encore une fois nous avons pu observer une forte augmentation de l'activité de la CTSD uniquement en présence d'ADAM30^{wt} (Fig.42). Pour consolider ces observations, nous aurions pu muter la CTSD au niveau du site de coupure potentiel d'ADAM30. Cependant comme précisé précédemment, le site de coupure potentiel d'ADAM correspond au site d'autocatalyse activatrice de la CTSD. Cette mutation n'aurait donc pas pu nous confirmer si la baisse d'activité de la CTSD espérée était le résultat d'une impossibilité de la part d'ADAM30 de couper et donc d'activer la CTSD ou tout simplement si la CTSD était incapable de s'auto-activer. Une autre possibilité que nous pourrions mettre en place est la production d'un peptide de synthèse correspondant à la région comprenant le site d'autocatalyse de la CTSD, à l'image de la technique utilisée dans le kit de mesure d'activité de la CTSD que nous employons déjà. Ce peptide piègerait un fluorophore (technique du quenching) qui serait libéré par la coupure de ce peptide par ADAM30. En mutant ce site de coupure synthétique, nous pourrions avoir la confirmation de l'implication d'ADAM30 dans le clivage direct de la CTSD.

Enfin nous avons mesuré l'activité de la CTSD dans le cortex de nos souris et seules les souris exprimant ADAM30^{wt} (soit les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKIIα/Cre et ADAM30^{wt}-CamKIIα/Cre) présentent une activité de la CTSD nettement augmentée par rapport aux autres lignées de souris n'exprimant pas ADAM30 ou exprimant un ADAM30^{mut} (Fig.43 et 44). De façon intéressante, nous avons constaté que ces souris exprimant ADAM30^{wt} ne présentaient pas d'augmentation de l'expression de la CTSD au niveau du cortex (Fig.45). Tous ces résultats convergent donc vers notre hypothèse de départ et valident le fait qu'ADAM30 soit capable de cliver et d'activer la CTSD sans augmenter son

expression. Nous avons pu également constater qu'il semble y avoir une corrélation positive entre le niveau d'activité de la CTSD et la concentration en A β dans le cortex des souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-CamKII α /Cre renforçant ainsi notre hypothèse (Fig.46). La CTSD étant une protéine lysosomale mais aussi de l'endosome tardif et capable d'être clivée et activée par ADAM30, nous avons supposé que ces deux protéines devaient nécessairement être localisées dans les mêmes compartiments cellulaires à un moment donné. Cette hypothèse fût vérifiée par immunofluorescence mais aussi par PLA (Fig.48) où nous avons pu observer que cette colocalisation se situerait au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (Fig.49).

Dans notre étude, une des limites de la technique du COFRADIC-SILAC est la possibilité d'avoir des faux positifs. En effet, les peptides identifiés peuvent correspondre à une protéine n'ayant potentiellement pas de réel lien avec ADAM30, donc être un artéfact. Pour vérifier cela, nous avons utilisé différents inhibiteurs spécifiques ou à large spectre des cathepsines et avons constaté que seule la pepstatine, l'inhibiteur de la CTSD, inhibe l'effet d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP. De manière intéressante nous avons pu constater que seule, la pepstatine induit une augmentation de production des peptides amyloïdes (Fig.50). La CTSD serait donc la seule cathepsine nécessaire à ADAM30 pour moduler le métabolisme de l'APP. Ce résultat était attendu et soutient les observations disponibles dans la littérature montrant que la CTSD est capable de métaboliser et/ou dégrader l'APP (Sadik et al. 1999, Nixon et al. 2000, Malik et al. 2011). Cependant, en utilisant un inhibiteur de cette protéase nous avons pu constater une accumulation de peptides amyloïdes. Ce résultat tend à appuyer l'étude de Malik et al. de 2011 montrant que la CTSD dégrade l'APP sans générer de peptide amyloïde contrairement aux études précédentes (Sadik et al. 1999, Nixon et al. 2000).

La CTSD n'est pas la seule cathepsine présente dans le lysosome ni la seule à être impliquée dans le catabolisme de l'APP comme par exemple la CTSB, la CTSE ou la CTSL (Mackay et al. 1997, Klein et al. 2009). Chez la souris, il a été montré que la CTSB est capable de dégrader l'A β issu de la sur-expression de l'APP humain (Wang et al. 2012). Nous aurions pu envisager de mesurer l'activité de la CTSB sans nos modèles de souris (la plus proche de la CTSD) cependant il a été montré que la CTSB ne clive pas l'APP^{Swe} chez les souris le sur-exprimant (Hook et

al. 2008). Ceci tend à renforcer nos résultats concernant l'impact d'ADAM30 sur la CTSD uniquement.

Tous nos résultats semblent converger vers une importance de la voie endosome/lysosome pour l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP. Cette voie est une des voies de dégradation principale de la cellule mais il en existe aussi deux autres principales : le protéasome ou encore l'autophagie dont la voie de la CMA fait partie (*Fig.18*). Le lysosome n'est pas un compartiment exclusif de la voie de dégradation endosome/lysosome et appartient aussi à la l'autophagie (*Bandyopadhyay et al. 2010, Dice et al. 2007*). C'est pourquoi nous avons utilisé des inhibiteurs de ces voies de dégradations pour déterminer si l'effet d'ADAM30 est dépendant de l'une d'elles. Nous avons constaté que si l'inhibiteur de la voie endosome/lysosome inhibe l'effet d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP, cela n'est pas le cas pour l'inhibiteur du protéasome (*Fig.51*). Nous avons alors supposé qu'ADAM30 pouvait être impliquée dans la dégradation de l'APP en activant spécifiquement la cathepsine D au sein de la voie endosome/lysosome. Pour consolider cette hypothèse, nous avons traité nos lignées stables HEK293-APP^{695wt}-ADAM30^{wt} ou HEK293-APP^{695wt} avec l'inhibiteur du lysosome, celui de la CTSD ou avec l'inhibiteur d'autres cathepsines et avons mesuré l'accumulation et l'internalisation de l'APP à la membrane (*Fig.52*). Le traitement à la bafilomycine a entraîné une accumulation d'APP attendu. En effet, la bafilomycine est un inhibiteur des pompes à protons vacuolaires empêchant l'acidification des vésicules, cette inhibition du lysosome et donc de la voie de dégradation de l'APP ainsi que de la voie amyloïdogène conduit à une accumulation de l'APP dans ces vésicules (*Vingtdeux et al. 2007a et 2007b*). Cependant, la sur-expression d'ADAM30^{wt} dans ces cellules n'a pas modifié cette accumulation. En revanche, le traitement des cellules à la Pepstatine génère moins d'accumulation d'APP au sein du lysosome mais la sur-expression d'ADAM30^{wt} entraîne une nette augmentation de cette accumulation. Ceci suggère donc que la dégradation/accumulation d'APP dans la cellule est en partie dépendante d'ADAM30 et de l'activité de la CTSD. Cette voie de dégradation endosome/lysosome est extrêmement importante pour l'APP tant pour sa dégradation que pour la voie amyloïdogène. Il existe dans la partie C-terminale de l'APP plusieurs séquences consensus gérant l'adressage de l'APP à la membrane ou dans différents compartiments cellulaires (*Fig.53*) (*Lai et al. 1995 ; Kouchi et al.*

1998 ; Kouchi *et al.* 1999). Ainsi l'APP possède une séquence consensus d'adressage au lysosome dans ses 8 derniers acides aminés C-terminaux (Lai *et al.* 1995, Braulke et Bonifacino, 2009). En effectuant une délétion de ces 8 derniers acides aminés, nous avons pu constater une perte de l'effet d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP (Fig.54). Or cette séquence de 8 acides aminés contient plusieurs séquences consensus. Nous avons donc muté la séquence d'adressage au lysosome et avons observé les mêmes effets que lors de la délétion totale des 8 derniers acides aminés (Fig.55). Ces résultats semblent donc confirmer que la séquence d'adressage au lysosome est essentielle quant à l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP. Toutes ces informations obtenues convergent vers l'établissement d'un nouvel axe pour le métabolisme de l'APP faisant intervenir l'adressage de l'APP au lysosome, une activation de la CTSD dépendante d'ADAM30 et une dégradation de l'APP.

3.B. IRS4, élément clé de l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP ?

Le métabolisme de l'APP est complexe et la production/dégradation des produits du métabolisme de l'APP fait intervenir différents processus interagissant entre eux dans lesquels le rôle d'ADAM30 est difficile à appréhender. C'est pourquoi nous avons commencé à investiguer d'autres substrats d'ADAM30 potentiellement impliqués dans le métabolisme de l'APP. En plus d'être en tête de liste des substrats potentiels d'ADAM30 obtenus par la technique du COFRADIC-SILAC (Tab.6), IRS4 est un élément de la voie de la signalisation de l'insuline, voie connue pour être impliquée (de part son récepteur à l'insuline) dans la modulation du métabolisme de l'APP (Killick *et al.* 2009). Enfin, une étude GWA récemment effectuée sur le diabète de type 2 a identifié le gène d'ADAM30 comme potentiellement associé avec le diabète de type 2 (Ho *et al.* 2013) or, de plus en plus de données font converger diabète et maladie d'Alzheimer (Merlo *et al.* 2010, Talbot *et al.* 2012).

IRS4 fait partie de la famille des substrats du récepteur à l'insuline (Fig.38). Cette famille contient actuellement 6 membres connus (IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, IRS5 ou DOK4 et IRS6 ou DOK5) dont IRS1 et IRS2 sont les membres les plus importants pour le métabolisme glucidique (Cai *et al.* 2003). Toutes les IRS ont en commun d'être phosphorylées et activées par une tyrosine kinase, le récepteur à

l'insuline. Enfin, si IRS1 et IRS2 sont largement exprimées dans la quasi totalité des tissus humains, l'expression d'IRS4 est retrouvée principalement dans le cerveau (hypothalamus), le rein, le foie... mais de manière beaucoup plus faible (Fantin *et al.* 1999). Il existe une lignée cellulaire ayant physiologiquement une expression élevée d'IRS4 : les cellules HEK293 (Lavan *et al.* 1997, Fantin *et al.* 1998). C'est pourquoi nos travaux sur IRS4 ont débuté sur notre lignée HEK293-APP^{695wt}.

Peu de données étant disponibles sur IRS4 et son implication dans le métabolisme de l'APP, nous avons surexprimé cette protéine dans nos cellules HEK293-APP^{695wt} et nous avons pu constater une augmentation de production des métabolites de l'APP (Fig.56). IRS4 est une protéine cytoplasmique proche de la membrane plasmique et pourrait donc favoriser la stabilisation de l'APP à la membrane conduisant ainsi à une augmentation du métabolisme de l'APP en limitant la dégradation de l'excès d'APP. Il se pourrait donc qu'IRS4 ait un effet antagoniste à celui d'ADAM30. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons également surexprimé ADAM30^{wt/mut} dans nos cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant IRS4. Nous avons alors observé que l'effet d'IRS4 sur le métabolisme de l'APP est diminué par la surexpression d'ADAM30^{wt} uniquement (Fig.57). Il semblerait donc que le domaine catalytique d'ADAM30 soit nécessaire pour obtenir cet effet. Nous en avons alors déduit qu'ADAM30 pouvait potentiellement cliver IRS4 et ainsi limiter l'accumulation d'APP à la membrane. Grâce à la technique du COFRADIC-SILAC nous avons pu obtenir le site de coupure potentiel d'ADAM30 sur l'IRS4. En surexprimant IRS4 dont ce site avait été muté, nous avons pu observer que cette mutation ne modifiait pas son effet sur le métabolisme de l'APP (Fig.57). Cependant en surexprimant ADAM30^{wt}, nous n'avons plus observé de diminution de l'effet d'IRS4 sur le métabolisme de l'APP. Il semblerait donc que cette séquence de coupure soit importante pour qu'ADAM30 limite l'effet d'IRS4 par clivage. De façon intéressante, si nous avons pu observer une colocalisation de l'APP et d'IRS4 par immunofluorescence et PLA, nous n'avons pas pu confirmer une interaction directe par immunoprécipitation (Fig.58 et 59). Ces résultats restent préliminaires et il est possible que ces immunoprécipitations soient faussées ou que l'interaction soit trop labile pour qu'on puisse la détecter. Néanmoins, la littérature nous indique qu'IRS4 est un intermédiaire dans la voie de signalisation de l'insuline. Elle interagit avec d'autres protéines transductrices du signal comme Grb2 et PI3K (Fig.38) (Fantin *et*

al, 1999, Karas et al. 2001, Hinsby et al. 2004). Il est donc possible qu'IRS4 puisse interagir avec l'APP de manière indirecte via l'une de ces protéines. Puisque la partie C-terminale de l'APP contient la grande majorité des séquences consensus d'interaction de l'APP avec d'autres protéines, nous avons voulu savoir si la sur-expression d'IRS4 en présence d'un APP dont les 8 derniers acides aminés ont été délétés ou dont les séquences consensus ont été mutées modifiait la colocalisation observée précédemment par immunofluorescence et PLA (Fig.60). Nous avons pu observer que seule la sur-expression de l'APP Δ C8 provoquait une diminution de la colocalisation avec IRS4. Or dans la partie C-terminale de l'APP, les résidus thréonine et tyrosine (en position 668 et 682) phosphorylables intervenant dans la régulation de l'APP sont présents et la séquence ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ est connue pour interagir avec de nombreuses protéines appartenant à des voies de signalisation comme Grb2 (Karas et al. 2001, Nizzari et al. 2007, Barbagallo et al. 2010). D'ailleurs il a été montré que l'interaction de Grb2 avec l'APP est augmentée dans les cerveaux de cas Alzheimer (Russo et al. 2002). Nous avons alors émis l'hypothèse que Grb2 pourrait être le facteur manquant entre IRS4 et l'APP. Récemment nous avons réalisé une mutation de la tyrosine 682 de l'APP. Les souris surexprimant d'un APPY682G présentent une large redistribution du métabolisme de l'APP en défavorisant la voie amyloïdogène au profit de la voie non-amyloïdogène (Barbagallo et al. 2010). Dans nos cellules, cette mutation a eu pour conséquence une diminution marquée de la colocalisation observée entre l'APP et IRS4 par immunofluorescence et PLA. Bien que de nombreux travaux soient encore nécessaires pour établir un véritable lien entre l'APP, IRS4 et ADAM30, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une interaction indirecte entre IRS4 et l'APP via Grb2 favorisant l'ancrage de l'APP à la membrane, cette interaction serait limitée par ADAM30 en clivant IRS4.

4. Conclusion

Notre approche multidisciplinaire nous a permis d'établir qu'ADAM30 est un nouvel acteur du métabolisme de l'APP que ce soit chez l'Homme, dans nos modèles cellulaires où dans notre modèle murin. Il est cependant encore difficile de déterminer toute l'étendue de l'interaction d'ADAM30 avec le métabolisme de l'APP. Le métabolisme de l'APP repose sur un principe d'équilibre entre production et

dégradation (Fig.61). En effet, après maturation au niveau de l'appareil de Golgi, l'APP est acheminé à la surface cellulaire où il entre en partie dans la voie non-amyloïdogène. L'autre partie est endocytée dans la voie endosome/lysosome où les β et γ -sécrétases métabolisent l'APP en peptide amyloïde. Les endosomes précoces et tardifs de cette voie peuvent aussi être renvoyés à la membrane libérant ainsi les APPs- β et les peptides amyloïdes. L'APP peut aussi être directement acheminé avant d'arriver à la membrane plasmique où avant d'entrer dans les voies amyloïdogène ou non amyloïdogène et ainsi entrer dans la voie endosome/lysosome où il va être directement dégradé. Ce mécanisme physiologique limite l'accès de l'APP à son métabolisme classique et donc évite son emballement (emballement conduisant à une augmentation de production de peptides amyloïdes et donc progressivement à la maladie d'Alzheimer). La comparaison de nos données obtenues sur ADAM30 avec ce mécanisme suggère fortement qu'ADAM30 puisse être impliquée dans un processus compétitif qui maintiendrait l'équilibre entre recyclage de l'APP vers la membrane (et donc vers son métabolisme) et la dégradation de l'APP au sein du lysosome (Fig.61). Il est cependant aussi possible qu'ADAM30 puisse directement favoriser l'acheminement de l'APP vers la voie endosome/lysosome pour une dégradation directe (Lorenzen et al. 2010) mais cette possibilité est limitée par le fait que nous n'ayons pas observé de diminution de l'internalisation de l'APP suite à la sur-expression d'ADAM30. Nous avons pu montrer qu'ADAM30 est un nouvel élément clé du métabolisme de l'APP impliquant la dégradation de l'APP via un adressage spécifique vers le lysosome, dégradation favorisée par l'activation ciblée de la CTSD par ADAM30. De ce fait, ADAM30 réduirait l'accessibilité de l'APP vers les différentes sécrétases conduisant ainsi à une diminution de production de tous les produits du métabolisme de l'APP, ce que nous avons pu confirmer dans nos modèles cellulaires et animaux.

Nos travaux effectués mettent donc en lumière une potentielle nouvelle voie de contrôle du pool des protéines substrats de la CTSD par une activation ciblée de cette protéase par ADAM30. Cela sous entend qu'il existe probablement des mécanismes non découverts incluant d'autres substrats d'ADAM30 pouvant expliquer cette spécificité d'action. Aussi nos travaux préliminaires menés sur IRS4 suivent cette logique. Bien qu'il soit prématuré d'établir un lien direct entre IRS4,

ADAM30 et l'APP, il se pourrait que ce mécanisme participe à cette « spécificité » d'action d'ADAM30 pour le métabolisme de l'APP.

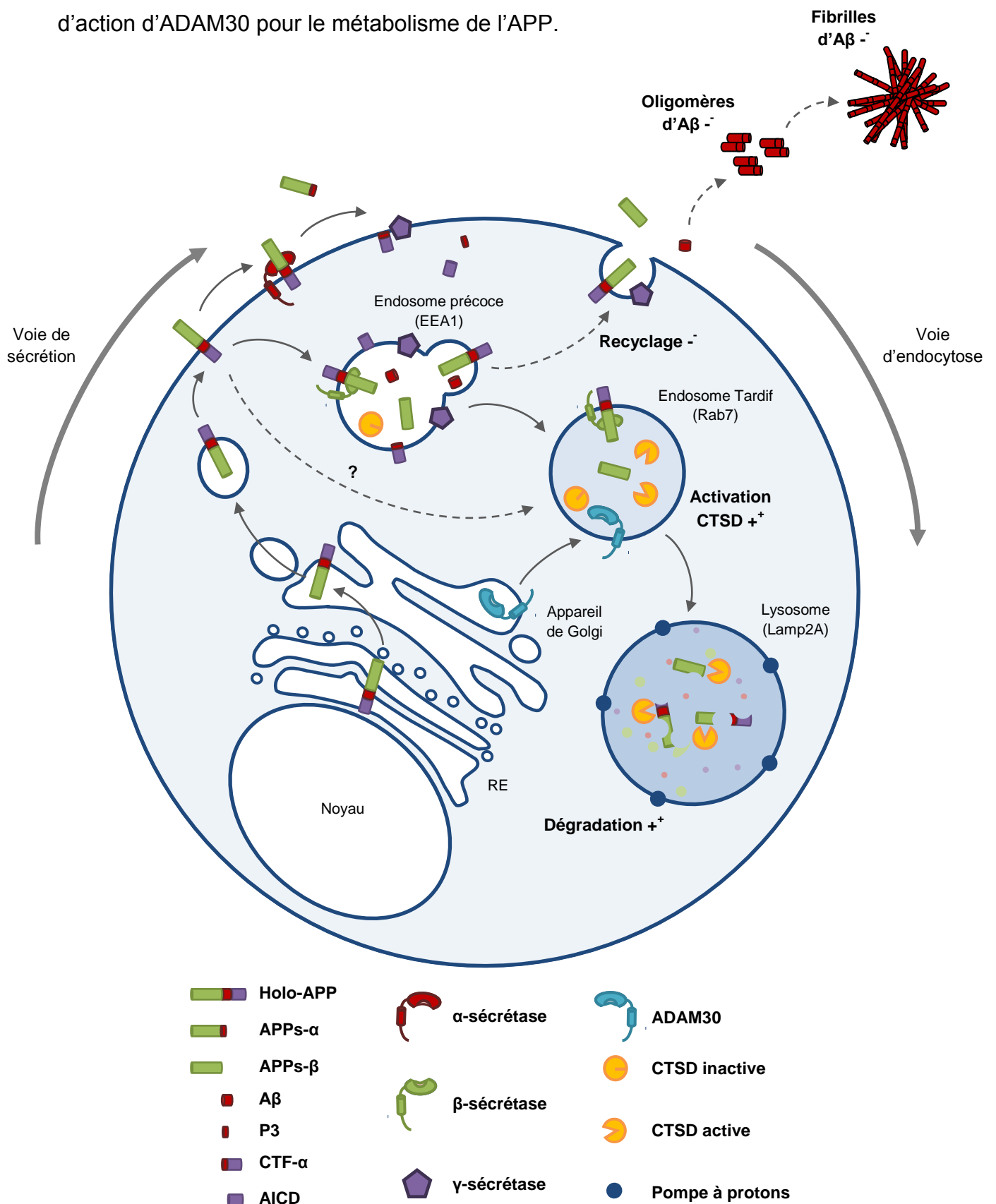


Figure 61. Schéma bilan de l'hypothèse de l'implication d'ADAM30 dans la régulation du métabolisme de l'APP. ADAM30 augmente l'activité de la CTSD favorisant ainsi la dégradation de l'APP au sein du lysosome. Ceci pourrait limiter le recyclage de l'APP vers la membrane et donc l'entrée dans son métabolisme. Au final cela contribuerait à une réduction de la production et au relargage des peptides amyloïdes. ADAM30 pourrait aussi favoriser un acheminement direct de l'APP vers la voie de dégradation endosome/lysosome.

5. Perspectives de recherches

Terminer la caractérisation de la relation ADAM30-CTSD dans le modèle animal

Nous travaillons actuellement sur la mise en évidence par Western Blot de l'expression d'ADAM30 dans nos lignées de souris la sur-exprimant. Il est aussi nécessaire de valider le clivage et l'activation de la CTSD par ADAM30 par Western Blot. Pour cela, nous avons choisi pour des raisons techniques d'effectuer nos travaux non pas sur des extraits de tissus cérébraux comme c'est le cas pour la mesure de l'activité de la CTSD mais sur des cultures de neurones adultes issus de nos souris âgées de 10mois.

Continuer la caractérisation de notre modèle animal

Nous envisageons d'adopter une approche plus longitudinale en mesurant nos différents paramètres à 6 et à 10mois. Ceci nous permettrait de savoir si la sur-expression d'ADAM30 a un effet protecteur contre l'accumulation progressive des peptides amyloïdes et limite l'apparition des symptômes observés chez les souris âgées de 10mois. Il serait notamment intéressant de mesurer par RT-qPCR et Western Blot les différents marqueurs de l'inflammation comme les interleukines (Il-1, Il-10) ou le TNF- α .

Nous allons également réaliser différents tests comportementaux afin de mesurer l'impact d'ADAM30 sur l'aspect cognitif de la pathologie amyloïde. Dans un premier temps un test simple sera mis en place : le test de nidification ou Nesting ([Deacon *et al.* 2007](#), [Filali et Lalonde, 2009](#)). Ce test consiste à déposer dans la cage de l'animal à étudier un carré de ouate de cellulose durant la nuit. La souris est un animal dont la phase principale d'activité est nocturne. La souris confectionne un nid avec cette ouate de cellulose ce qui correspond à un comportement « normal » de protection de l'animal. Ce test comportemental n'est pas un test de mémoire mais permet d'analyser le bien-être animal. Ce test est subjectif puisque la forme du nid est notée sur une échelle de 1 à 5, 5 étant un nid terminé et couvrant totalement ou partiellement la souris et 1 un carré de ouate non déchiqueté. Bien que simple et subjectif, ce test présente de nombreux avantages en comparaison avec d'autres tests comportementaux plus classiques. Ainsi, ce test est réalisé durant la nuit,

meilleure période d'activité des souris. Les souris ne sont ni manipulées ni installées dans un environnement radicalement différent de leur hébergement (les cages utilisées pour le test sont similaires aux cages d'hébergements). Enfin, ce test se passe en l'absence d'expérimentateurs réduisant ainsi les biais liés au stress générés par la présence humaine. Nous allons également mettre en place deux autres tests de comportement plus objectifs basés sur l'analyse de la mémoire des animaux. Le test de reconnaissance d'objet et le test du Barnes Maze seront ainsi développés.

Approfondir la caractérisation du lien entre IRS4, l'APP et ADAM30

Nous avons pu mesurer l'expression de différentes IRS dans le cortex de nos différentes lignées de souris et avons constaté que l'expression d'IRS4 est très faible. Ce résultat est attendu puisque l'expression d'IRS4 est très faible et la zone d'expression la plus élevée se situe au niveau de l'hypothalamus ([Fantin et al. 1999](#)). L'hypothalamus est une région cérébrale centrale pour la régulation de nombreux métabolisme comme par exemple la prise alimentaire. C'est pourquoi nous allons prélever l'hypothalamus. Ceci nous permettra de mesurer les variations de l'expression d'IRS4 en fonction de nos différentes lignées de souris, mais aussi de voir si ADAM30 (exprimée majoritairement au niveau de l'hippocampe) conserve aussi son effet au niveau de l'hypothalamus.

Puisque nos résultats en biologie cellulaire semblent potentiellement indiquer un lien entre ADAM30, l'APP et IRS4, qu'il existe un différentiel de poids entre nos lignées de souris et que de nombreuses études semblent faire converger diabète (ou tout du moins métabolisme de l'insuline) et maladie d'Alzheimer, nous allons développer un protocole basé sur un régime riche en acide gras ou High Fat Diet et analyser ainsi l'impact sur le métabolisme de l'APP et IRS4.

Une des limites de notre étude est l'utilisation de cellules HEK293 pour effectuer nos expérimentations sur IRS4. Ce modèle cellulaire possède de nombreux avantages dont celui d'exprimer fortement IRS4 mais n'est pas un modèle neuronal et n'est donc pas un modèle véritablement idéal pour travailler sur la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi nous souhaitons répliquer nos différentes expériences menées sur IRS4 dans notre second modèle cellulaire : les cellules issues de neuroblastome humain SKNSH-SY5Y.

Bien qu'un lien entre APP, IRS4 et ADAM30 semble se dessiner dans notre modèle cellulaire HEK293, nous avons pu montrer qu'ADAM30 n'est pas localisée au niveau de la membrane plasmique. Il se pourrait donc qu'ADAM30 réduise l'accès d'IRS4 à la membrane en la clivant au niveau de la voie de sécrétion ou dans l'appareil de Golgi. Pour vérifier cette hypothèse nous devons établir s'il existe une interaction directe entre ADAM30 et IRS4 et où se situe une telle interaction grâce notamment au PLA entre ADAM30 et IRS4 et la présence de marqueurs des différents compartiments de la voie de maturation et de sécrétion des protéines.

En ce qui concerne l'interaction IRS4-APP, nous avons suffisamment d'éléments pour considérer une interaction indirecte entre ces deux protéines. C'est pourquoi il est maintenant impératif de déterminer quel est cet intermédiaire. Parmi les protéines connues interagissant avec IRS4, Grb2 semble la cible prioritaire puisqu'elle interagit aussi avec l'APP via la séquence consensus ⁶⁸²YENPTY⁶⁸⁷ (Karas et al. 2001, Nizzari et al. 2007, Barbagallo et al. 2010). Pour cela, nous devons mettre au point des immunoprécipitations entre IRS4 et Grb2 ainsi qu'entre l'APP et Grb2. Si une telle interaction existe, l'utilisation de notre APP^{Y682A} devrait entraîner une perte d'interaction avec Grb2 observable par immunoprécipitation. Nous avons déjà observé une baisse d'interaction entre l'APPY682A et IRS4 par immunofluorescence et PLA. Nous pourrions donc réaliser ces mêmes immunofluorescences et PLAs mais cette fois ci entre IRS4 et Grb2 puis entre Grb2 l'APP^{695wt} ou l'APP^{Y682A}.

Table des illustrations

- Introduction -

Figure 1. Estimations de progressions de la démence dans le monde et en France. D'après le rapport de Genève de l'OMS du 11 avril 2012 _____ - 31 -

Figure 2. Comparaison de deux cerveaux de patients : l'hémisphère à gauche appartient à un patient « sain », l'hémisphère à droite provient d'un patient Alzheimer. On note une forte atrophie des zones du langage et de la mémoire, une dilatation très marquée du 3^e ventricule, un creusement des sillons et une diminution des circonvolutions. Image Alz.org _____ - 34 -

Figure 3. Représentations et images de dégénérescences neurofibrillaires. Les filaments violets représentent les filaments issus de l'agrégation intra neuronale de protéines Tau anormalement hyperphosphorylées. L'image d'immunomarquage des protéines Tau provient d'un cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer _____ - 35 -

Figure 4. Représentation de l'implication physiopathologique de Tau dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules. Son hyperphosphorylation au cours de la pathologie conduit à une désagrégation des microtubules, à la déstabilisation du cytosquelette puis à la mort neuronale. D'après Hanger et al. 1998 et Braak et al. 1994 _____ - 36 -

Figure 5. Représentations et images de dépôts amyloïdes. Il en existe deux types : les plaques séniles et les dépôts diffus. Les images proviennent de cerveaux de patients Alzheimer _____ - 38 -

Figure 6. Schématisation de la localisation des dégénérescences neurofibrillaires au cours de la maladie d'Alzheimer selon six stades. L'intensité de la coloration est corrélée à la quantité de dégénérescences neurofibrillaires. Ann Neurol Adapté de Braak et al. 1991 - 39 -

Figure 7. Schématisation de la localisation des dépôts amyloïdes au cours de la maladie d'Alzheimer selon trois stades. L'intensité de la coloration est corrélée à la quantité de dépôts. Ann Neurol Adapté de Braak et al. 1991 _____ - 39 -

Figure 8. Progression de la perte neuronale au cours de la maladie d'Alzheimer. Les premiers neurones atteints sont les neurones pyramidaux du cortex entorhinal projetant sur l'hippocampe (B). Les régions sous corticales sont ensuite touchées avec la perte des fibres ascendantes provenant du noyau basal de Meynert (nbM), du noyau du Raphé (NR) et du locus coeruleus (LC) (C et D). (Braak et al. 1998, Palmer 2002) _____ - 40 -

Figure 9. Représentation schématique des différents membres de la famille de l'APP : l'APP⁷⁷⁰, l'APP⁷⁵¹, l'APP⁷¹⁴ et l'APP⁶⁹⁵, APLP1 et APLP2 _____ - 42 -

Figure 10. Représentation schématique du clivage séquentiel de l'APP par les α et γ -sécrétases impliquées dans la voie non-amyloïdogène. Cette voie localisée à la membrane plasmique ne conduit pas à la libération de peptides amyloïdes _____ - 44 -

Figure 11. Représentation schématique du clivage séquentiel de l'APP par les β et γ -sécrétases impliquées dans la voie amyloïdogène. Cette voie localisée essentiellement au niveau endosomes/lysosomes permet la libération du peptide amyloïde. Dans la maladie d'Alzheimer, ce peptide s'accumule puis s'oligomérisse et enfin forme des fibrilles _____ - 45 -

Figure 12. Représentation d'une α -sécrétase et de son action catalytique sur l'APP au niveau de la membrane plasmique _____ - 46 -

Figure 13. Représentation d'une β -sécrétase et de son action catalytique sur l'APP au niveau des endosomes essentiellement _____ - 48 -

Figure 14. Représentation du complexe de la γ -sécrétase et de ses différents constituants. La préséniline nécessite un clivage protéolytique pour se dimériser et être active. Est aussi représentée la conformation spatiale du complexe de la γ -sécrétase et son action catalytique sur l'APP au niveau de la membrane plasmique et des endosomes essentiellement. D'après De Strooper et al. 2012 _____ - 51 -

Figure 15. Hypothèse initiale de la cascade amyloïde. Une séquence d'évènements spécifiques partant d'une mutation du gène de l'APP, PS1 ou PS2 conduit progressivement à la démence de type Alzheimer. D'après Hardy, 1992 _____ - 56 -

Figure 16. Schématisation de l'évolution de la cascade amyloïde tenant compte des nouvelles hypothèses : stress oxydatif et métabolisme et Tau. Cette actualisation centralise l'A β x-42, son accumulation/diminution et sa clairance progressive, exacerbés par le stress oxydatif et les problèmes métaboliques apparaissant au cours du vieillissement _____ - 73 -

Figure 17. Motifs spécifiques présents dans la partie C-terminale de l'APP₆₉₅, de l'APLP1 et de l'APLP2 _____ - 76 -

Figure 18. Représentation schématique des différentes voies d'autophagie dans la cellule. Seule la CMA est une voie spécifique de dégradation nécessitant un motif particulier présent dans la partie C-terminale des protéines cytosoliques. D'après Feng et al. 2014 et Wiraman et al. 2012 _____ - 79 -

Figure 19. Hiérarchisation des 21 ADAMs humaines. Les deux tiers des ADAMs possèdent une activité protéase et un tiers présente une localisation testiculaire. D'après Edwards et al. 2008 _____ - 83 -

Figure 20. Représentation schématique des différents domaines d'une ADAM. Les fonctions connues pour chaque domaine sont précisées. D'après Duffy et al. 2009 _____ - 84 -

Figure 21. Représentation de la structure en « C » des ADAMs. Cette forme caractéristique est donnée par les domaines disintégrine et riches en cystéines. La poche catalytique est alors orientée vers la membrane tandis que les domaines du coude s'exposent aux protéines pouvant se lier aux ADAMs. D'après Yang et al. 2006 _____ - 86 -

Figure 22. (A) niveau d'expression d'ADAM30 dans le cerveau de 51 patients atteints de maladie d'Alzheimer (en gris) et 42 cerveaux issus de patients « sains » (en blanc). (B) Nuage de point montrant l'association des dépôts d'A β x-42 dans le cerveau des patients Alzheimer avec le niveau d'expression d'ADAM30. _____ - 95 -
Les quantifications d'ARNm ont été réalisées en triplicata chez tous les individus (contrôles n=42, cas n=51). Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les cas et les contrôles. Ligne fine: moyenne. Ligne fine haute: inclusion de 75% des individus (premier quartile). Ligne fine basse: inclusion de 25% des individus (troisième quartile). Cercles: individus présentant des valeurs extrêmes (en dehors de la distribution globale). Les tests statistique effectués sont un test non-paramétrique de Mann-Whitney pour A et un test non-paramétrique de Spearman pour B.

Figure 23. Mesure par WB et ELISAs des APPs- α , APPs- β , A β 1-40 et A β 1-42 après sur-expression d'un vecteur Sh vide ou d'un vecteur contenant un ShRNA dirigé contre ADAM30 dans des cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt}. Quatre expériences indépendantes en duplicata _____ - 96 -

Test statistique utilisé: test student

Figure 24. Mesure par WB et ELISAs des APPs- α , APPs- β , A β 1-40 et A β 1-42 après sur-expression d'un vecteur vide d'ADAM30^{wt} ou d'ADAM30^{mut} dans des cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} (A) ou dans des cellules HEK293-APP^{695wt} (B). Quatre expériences indépendantes en duplicata. Les A β 1-42 ne sont pas détectés en ELISA pour les HEK293-APP^{695wt} _____ - 97 -
Test statistique utilisé: test student

Tableau 1. Tableau récapitulatif des différentes localisations des ADAMs, l'effet de leur KO dans des modèles murins ainsi que les pathologies connues associées à ces ADAMs. D'après Yang et al. 2006 et Edwards et al. 2008 _____ - 92 -

- Matériel et méthodes -

Figure 25. Représentation des différents croisements de lignées de souris effectués pour obtenir nos souris triples transgéniques. _____ - 123 -

Il est à noter que les fonds génétiques pour les souris ADAM30 et les souris APP ou Cre sont différents (C57Bl6/N ou J). Les travaux sont effectués sur la génération F1 des souris triples transgéniques.

Figure 26. Etapes de la reconstitution des cerveaux de souris en 3D. (A) Photos compilées des coupes du bloc d'inclusion reformant le volume initial de l'hémisphère. (B) Identification des différentes zones cérébrales sur le volume reconstitué en prenant comme base l'atlas 3D de cerveau de souris du MRI. (C) Compilation des différentes immunohistochimies (avec l'anticorps 6E10) en prenant comme base le volume reconstitué en 3D du bloc d'inclusion. (D) Identification et isolation numérique des dépôts amyloïdes à partir des immunohistochimies précédentes. _____ - 106 -

Figure 27. Schématisation des différentes étapes de l'identification des substrats d'ADAM30 en associant COFRADIC, SILAC et marquage N-terminal des protéines. _____ - 108 -

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour génotyper les souris. _____ - 102 -

Tableau 3. Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour la qPCR sur les différentes lignées de souris. _____ - 103 -

Tableau 4. Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée. _____ - 115 -

Tableau 5. Tableau récapitulatif des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot, en Immunofluorescence et en PLA. Tous les anticorps utilisés ont été obtenus auprès de fournisseurs. _____ - 118 -

- Résultats -

Figure 28. Schémas de la construction comportant le gène d'ADAM30 sous contrôle du système Crelox et du promoteur GAG. _____ - 123 -

Figure 29. Représentation des différents croisements de lignées de souris effectués pour obtenir nos souris triples transgéniques _____ - 123 -

Il est à noter que les fonds génétiques pour les souris ADAM30 et les souris APP ou Cre sont différents (C57Bl6/N ou J). Les travaux sont effectués sur la génération F1 des souris triples transgéniques.

Figure 30. A.(femelles) et C.(mâles) Mesure du poids des animaux en fonction de leur génotype. Chaque point correspond au poids d'une souris. Les barres jaunes correspondent à la moyenne de poids de chaque lignée. B.(femelles) et D.(mâles) Mesure de la glycémie des différentes lignées de souris après 6h de jeun, à 0min (avant injection) puis à 15, 30, 60, 90 et 120min après injection intrapéritonéale de glucose. _____ - 125 -

Figure 31. Analyses par RT-qPCR des différents génotypes de nos lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut} _____ - 127 -

Figure 32. Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression de BACE1 dans nos lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut} _____ - 129 -

Figure 33. Variations de la concentration en Aβ42 dans l'hippocampe de différentes lignées de souris transgéniques exprimant ou non ADAM30^{wt/mut} _____ - 129 -

Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les différentes lignées de souris. Ligne fine centrale: moyenne. Lignes fines hautes et basses: premier et troisièmes quartiles. Cercles: individus ayant des valeurs extrêmes. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

Figure 34. Reconstructions tridimensionnelles des cerveaux de souris surexprimant ADAM30^{wt/mut} et analyses des dépôts amyloïdes _____ - 131 -

Figure 35. Quantification des dépôts amyloïdes à partir des analyses 3D précédentes dans le prosencéphale et l'hippocampe des souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut} _____ - 131 -

Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les différentes lignées de souris. Ligne fine centrale: moyenne. Lignes fines hautes et basses: premier et troisièmes quartiles. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

Figure 36. Mesure de l'activité de la γ (A) et β (B) sécrétase en présence ou non d'une sur-expression d'ADAM30^{wt/mut}. L'activité de la γ-sécrétase (mesure de l'intensité de fluorescence émise par son substrat) est mesurée en présence ou non d'un traitement inhibiteur de cette sécrétase _____ - 133 -

(A) Mesures *in vitro* réalisées 24 ou 48h après transfection d'ADAM30^{wt/mut}. Les membranes solubilisées des cellules HEK293 surexprimant (ou non) ADAM30 ont été incubées avec un C100-Flag (substrat de la γ-sécrétase). La quantité d'APP-Cter et d'Aβ par densitométrie. CT 4°C: membranes solubilisées purifiées à partir de cellules non transfectées et incubées avec le C100-Flag à 4°C. CT DFK: même protocole mais avec un inhibiteur de la γ-sécrétase le DFK167. DNA3: membranes solubilisées purifiées à partir de cellules transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) et incubées avec le C100-Flag. ADAM30^{wt/mut}: même protocole mais transfection avec ADAM30^{wt/mut}. (B)

Mesure *in vitro* de l'activité de la β -sécrétase en cinétique. Tests statistiques utilisés: tests students.

Figure 37. Observation par immunofluorescence de l'impact d'ADAM30 sur l'internalisation de l'APP dans les cellules HEK293-APP^{695wt} - 133 - 48h après transfection les cellules ont été incubées 1h à 4°C avec de l'anticorps 6E10 pour marquer l'APP à la surface membranaire. Pour induire l'internalisation de l'APP, les cellules ont été ensuite incubées à 37°C aux temps indiqués puis fixées pour l'immunofluorescence. Le graphique représente la variation moyenne de l'intensité de fluorescence de l'APP par cellules (n>10) pendant les temps indiqués.

Figure 38. Représentation schématique des protéines de la famille des IRS dont IRS4- 137 -

Figure 39. Représentation schématique de la CTSD et de son activation séquentielle - 137 -

Figure 40. Représentation du site de coupure potentiel d'ADAM30 sur la CTSD - 139 - Le site de coupure potentiel a été obtenu à partir des peptides issus de l'expérience de COFRADIC.

Figure 41. Mesure *In vitro* de l'activité de la CTSD après incubation avec le peptide substrat de la CTSD et de la BSA, de l'ADAM30^{wt} ou de l'ADAM30^{mut} - 141 - Expérience réalisée avec des protéines recombinantes humaines.

Figure 42. Mesure cinétique de l'activité de la CTSD dans les cellules HEK293-APP^{695wt} transfectées avec un vecteur vide, ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} - 141 - L'activité de la CTSD a été mesurée par deux expériences différentes et indépendantes. Mesure cinétique toutes les 5min entre 0 et 30min.

Figure 43. Mesure de l'activité de la CTSD dans le cortex des différentes lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut} - 143 - Trait épais: médiane de l'expression d'ADAM30 chez les différentes lignées de souris. Ligne fine centrale: moyenne. Lignes fines hautes et basses: premier et troisièmes quartiles. Cercles: animaux présentant des valeurs extrêmes. Test statistique: test non-paramétrique de Mann-Whitney.

Figure 44. Mesure cinétique de l'activité de la CTSD dans le cortex des différentes lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut} - 143 - L'activité de la CTSD a été mesurée par deux expériences différentes et indépendantes. Mesure cinétique toutes les 5min entre 0 et 30min.

Figure 45. Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression de la CTSD dans nos lignées de souris surexprimant ou non ADAM30^{wt/mut} - 145 -

Figure 46. Corrélation entre l'activité de la CTSD dans le cortex et la concentration en A β 42 solubles chez les souris ADAM30^{wt}-APP^{SweInd}-Cre - 145 -

Figure 47. Représentation schématique de la technique du Proximity Ligation Assay ou PLA _____ - 146 -

Les anticorps primaires (non représentés) se fixent sur leurs protéines respectives. Puis les anticorps secondaires couplés à des simples brins d'ADN (un "positif" et un "négatif" car complémentaires) se fixent sur les anticorps primaires. Les sondes nucléiques s'assemblent pour former un ADN double brin. L'ADN polymérase ajoutée va amplifier ce fragment une infinité de fois. Puis des sondes d'ADN marquée (fluorophore) vont se fixer sur l'ADN double brin.

Figure 48. Immunofluorescences et PLAs réalisés dans les cellules HEK293-APP^{695wt} transfectées avec ADAM30 et la CTSD _____ - 147 -

Les images du bas correspondent au PLA réalisé entre ADAM30^{wt} surexprimé et la CTSD endogène.

Figure 49. Immunofluorescences réalisées sur les cellules HEK293-APP^{695wt} transfectées avec ADAM30 et ciblant ADAM30 et différents marqueurs des compartiments cellulaire _____ - 147 -

EEA1: marqueur des endosomes précoces, Rab9: marqueur des endosomes tardifs, Lamps2: marqueur des lysosomes.

Figure 50. Mesure du métabolisme de l'APP par ELISAs et WB après traitement à la pepstatine, leupeptine ou E64D des cellules HEK293-APP^{695wt} transfectées avec un vecteur vide, ADAM30^{wt} ou ADAM30^{mut} _____ - 149 -

Traitements réalisés 48h après transfection et durant 24h aux concentrations indiquées. La moyenne des variations de la quantité des différents métabolites de l'APP est représentée. Quatre expériences ont été effectuées en duplicata.

Figure 51. Mesure du métabolisme de l'APP par ELISAs et WB après traitement à la chloroquine, bafilomycine ou lactacystine des cellules HEK293-APP^{695wt} transfectées avec un vecteur vide ou ADAM30^{wt} _____ - 151 -

Les traitements ont été réalisés 24h après transfection et pendant 16h aux concentrations indiquées. Les extraits cellulaires ont été analysés par WB et la quantité d'APPs-α a été mesurée par ELISA.

Figure 52. Observation par immunofluorescence et mesure de l'impact de l'inhibition de la dégradation de l'APP dans les cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant un vecteur vide ou ADAM30^{wt} _____ - 153 -

La dégradation de l'APP a été bloquée avec de la bafilomycine, de la pepstatine ou de la leupeptine pendant 24h aux concentrations indiquées. L'accumulation d'APP intracellulaire a été mesurée par immunofluorescence en utilisant l'anticorps LN27 dirigé contre la partie N-terminale de l'APP. Les graphiques représentent les moyennes des variations d'intensité de fluorescence par cellule (n>150) pour les concentrations de traitement indiquées.

Figure 53. Motifs spécifiques présents dans la partie C-terminale de l'APP⁶⁹⁵, de l'APLP1 et de l'APLP2. _____ - 155 -

Figure 54. Mesure par ELISAs et WB de l'impact de la sur-expression d'ADAM30 dans des cellules HEK293 surexprimant un APP^{695wt} ou un APPΔC8 _____ - 155 -

Quatre expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata 24h après transfection.

Figure 55. Mesure par ELISAs de l'impact de la sur-expression d'ADAM30 dans des cellules HEK293 surexprimant un APP^{695wt}, un APP Δ C8, un APP^{F690S} ou un APP^{E691V} _____ - 157 -
Quatre expériences indépendantes ont été réalisées en duplicata 24h après transfection.

Figure 56. Mesure par ELISAs et WB de l'impact de la sur-expression d'IRS4 sur le métabolisme de l'APP dans les cellules HEK293-APP^{695wt} _____ - 159 -
Trois expériences indépendantes ont été réalisées en triplicata.

Figure 57. Mesure par ELISAs de l'impact de la sur-expression d'IRS4^{wt/mt} avec celle d'ADAM30^{wt/mt} sur le métabolisme de l'APP dans les cellules HEK293-APP^{695wt} _____ - 159 -
Ces expériences sont préliminaire et n'ont été réalisées que deux fois en triplicata.

Figure 58. Observation par Immunofluorescences et PLAs d'IRS4 et de l'APP^{695wt} dans les cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant IRS4 _____ - 161 -

Figure 59. Immunoprécipitation d'IRS4 et de l'APP à partir des cellules HEK293-APP^{695wt} surexprimant IRS4 _____ - 161 -
Cette expérience est préliminaire et n'a été réalisée que deux fois.

Figure 60. Observation par immunofluorescence et PLAs d'IRS4 et de l'APP Δ C8, APP^{F690S}, APP^{E691V} ou APP^{Y682A} dans les cellules HEK293 surexprimant IRS4 et l'APP Δ C8, APP^{F690S}, APP^{E691V} ou APP^{Y682A} _____ - 163 -

Tableau 6. Liste des protéines obtenue par la méthode COFRADIC-SILAC présentant une surreprésentation d'un de leur peptide dans les cellules HEK293-ADAM30^{wt} comparé aux cellules HEK293-ADAM30^{mt} _____ - 135 -

- Discussion -

Figure 61. Schéma bilan de l'hypothèse de l'implication d'ADAM30 dans la régulation du métabolisme de l'APP. ADAM30 augmente l'activité de la CTSD favorisant ainsi la dégradation de l'APP au sein du lysosome. Ceci pourrait limiter le recyclage de l'APP vers la membrane et donc l'entrée dans son métabolisme. Au final cela contribuerait à une réduction de la production et au relargage des peptides amyloïdes. ADAM30 pourrait aussi favoriser un acheminement direct de l'APP vers la voie de dégradation endosome/lysosome. ____ - 182 -

Références bibliographiques

Acquati,F., Accarino,M., Nucci,C., Fumagalli,P., Jovine,L., Ottolenghi,S., and Taramelli,R. (2000). The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett.* 468, 59-64.

Ahljjanian,M.K., Barrezueta,N.X., Williams,R.D., Jakowski,A., Kowsz,K.P., McCarthy,S., Coskran,T., Carlo,A., Seymour,P.A., Burkhardt,J.E., Nelson,R.B., and McNeish,J.D. (2000). Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 97, 2910-2915.

Ahmed,R.R., Holler,C.J., Webb,R.L., Li,F., Beckett,T.L., and Murphy,M.P. (2010). BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 112, 1045-1053.

Ahn,K., Shelton,C.C., Tian,Y., Zhang,X., Gilchrist,M.L., Sisodia,S.S., and Li,Y.M. (2010). Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 107, 21435-21440.

Akter K, Lanza EA, Martin SA, Myronyuk N, Rua M, Raffa RB. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br J Clin Pharmacol.* 2011 Mar;71(3):365-76. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03830.x.

Alfandari,D., Cousin,H., Gaultier,A., Smith,K., White,J.M., Darribere,T., and DeSimone,D.W. (2001). *Xenopus* ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Curr Biol.* 11, 918-930.

Alikhani,N., Guo,L., Yan,S., Du,H., Pinho,C.M., Chen,J.X., Glaser,E., and Yan,S.S. (2011). Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid-beta degrading enzyme, PreP peptidasome, in Alzheimer's disease brain mitochondria. *J Alzheimers Dis.* 27, 75-87.

Almawi,W.Y., Nemr,R., Keleshian,S.H., Ectay,A., Saldanha,F.L., AlDoseri,F.A., and Racoubian,E. (2013). A replication study of 19 GWAS-validated type 2 diabetes at-risk variants in the Lebanese population. *Diabetes Res Clin Pract.* 102, 117-122.

Alonso Adel C, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34873-81.

Anandatheerthavarada,H.K., Biswas,G., Robin,M.A., and Avadhani,N.G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol.* 161, 41-54.

Andersen,O.M., Reiche,J., Schmidt,V., Gotthardt,M. , Spoelgen,R., Behlke,J., von Arnim,C.A., Breiderhoff,T., Jansen,P., Wu,X., Bales,K.R., Cappai,R., Masters,C.L., Gliemann,J., Mufson,E.J., Hyman,B.T., Paul,S.M., Nykjaer,A., and Willnow,T.E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 102, 13461-13466.

Ando,K., Brion,J.P., Stygelbout,V., Suain,V., Authelet,M., Dedecker,R., Chanut,A., Lacor,P., Lavaur,J., Sazdovitch,V., Rogaeva,E., Potier,M.C., and Duyckaerts,C. (2013). Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol.* 125, 861-878.

Anliker,B. and Muller,U. (2006). The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener.Dis.* 3, 239-246.

Anton,E.S., Ghashghaei,H.T., Weber,J.L., McCann,C., Fischer,T.M., Cheung,I.D., Gassmann,M., Messing,A., Klein,R., Schwab,M.H., Lloyd,K.C., and Lai,C. (2004). Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci.* 7, 1319-1328.

Araki,W., Saito,S., Takahashi-Sasaki,N., Shiraishi,H., Komano,H., and Murayama,K.S. (2006). Characterization of APH-1 mutants with a disrupted transmembrane GxxxG motif. *J Mol Neurosci.* 29, 35-43.

Area-Gomez,E., de Groof,A.J., Boldogh,I., Bird,T.D., Gibson,G.E., Koehler,C.M., Yu,W.H., Duff,K.E., Yaffe,M.P., Pon,L.A., and Schon,E.A. (2009). Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am J Pathol.* 175, 1810-1816.

Arribas,J., Bech-Serra,J.J., and Santiago-Josefat,B. (2006). ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 57-68.

Arribas,J., Coodly,L., Vollmer,P., Kishimoto,T.K. , Rose-John,S., and Massague,J. (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *J Biol Chem.* 271, 11376-11382.

Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA.Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol.* 2004 May;61(5):661-6.

Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S.Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 31;301(1):231-5.

Augert,A., Payre,C., de Launoit,Y., Gil,J., Lambeau,G., and Bernard,D. (2009). The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep.* 10, 271-277.

Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F.Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 2004 Apr;84(2):361-84.

Axe,E.L., Walker,S.A., Manifava,M., Chandra,P., Roderick,H.L., Habermann,A., Griffiths,G., and Ktistakis,N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 182, 685-701.

- B -

Bales,K.R., Verina,T., Dodel,R.C., Du,Y., Altstiel,L., Bender,M., Hyslop,P., Johnstone,E.M., Little,S.P., Cummins,D.J., Piccardo,P., Ghetti,B., and Paul,S.M. (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.* 17, 263-264.

Bandyopadhyay,U., Sridhar,S., Kaushik,S., Kiffin,R., and Cuervo,A.M. (2010). Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy. *Mol Cell.* 39, 535-547.

Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ.Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides.* 1997;18(8):1257-62.

Barbagallo,A.P., Weldon,R., Tamayev,R., Zhou,D., Giliberto,L., Foreman,O., and D'Adamio,L. (2010). Tyr(682) in the intracellular domain of APP regulates amyloidogenic APP processing in vivo. *PLoS One.* 5, e15503.

Baumann,K., Mandelkow,E.M., Biernat,J., Piwnica-Worms,H., and Mandelkow,E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett.* 336, 417-424.

Bednarski,E. and Lynch,G. (1996). Cytosolic proteolysis of tau by cathepsin D in hippocampus following suppression of cathepsins B and L. *J Neurochem.* 67, 1846-1855.

Beites,C.L., Kawauchi,S., Crocker,C.E., and Calof,A.L. (2005). Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res.* 306, 309-316.

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010 Dec;23(4):213-27. doi: 10.1177/0891988710383571.

Bell,R.D., Sagare,A.P., Friedman,A.E., Bedi,G.S., Holtzman,D.M., Deane,R., and Zlokovic,B.V. (2007). Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb.Blood Flow Metab.* 27, 909-918.

Benes,P., Vetvicka,V., and Fusek,M. (2008). Cathepsin D--many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol.Hematol.* 68, 12-28.

Bernstein,H.G., Sormunen,R., Jarvinen,M., Kloss,P., Kirschke,H., and Rinne,A. (1989). Cathepsin B immunoreactive neurons in rat brain. A combined light and electron microscopic study. *J Hirnforsch.* 30, 313-317.

Bernstein,H.G., Bukowska,A., Krell,D., Bogerts,B. , Ansorge,S., and Lendeckel,U. (2003). Comparative localization of ADAMs 10 and 15 in human cerebral cortex normal aging, Alzheimer disease and Down syndrome. *J Neurocytol.* 32, 153-160.

Black,R.A., Rauch,C.T., Kozlosky,C.J., Peschon,J.J., Slack,J.L., Wolfson,M.F., Castner,B.J., Stocking,K.L., Reddy,P., Srinivasan,S., Nelson,N., Boiani,N., Schooley,K.A., Gerhart,M.,

Davis,R., Fitzner,J.N., Johnson,R.S., Paxton,R.J., March,C.J., and Cerretti,D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. %20;385, 729-733.

Blacker,M., Noe,M.C., Carty,T.J., Goodyer,C.G., and LeBlanc,A.C. (2002). Effect of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons. *J Neurochem*. 83, 1349-1357.

Blobel,C.P., Wolfsberg,T.G., Turck,C.W., Myles,D.G., Primakoff,P., and White,J.M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*. %19;356, 248-252.

Bode,W., Gomis-Ruth,F.X., and Stockler,W. (1993). Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett*. 331, 134-140.

Boehm,J. (2013). A 'danse macabre': tau and Fyn in STEP with amyloid beta to facilitate induction of synaptic depression and excitotoxicity. *Eur J Neurosci*. 37, 1925-1930.

Borchelt,D.R., Thinakaran,G., Eckman,C.B., Lee,M.K., Davenport,F., Ratovitsky,T., Prada,C.M., Kim,G., Seekins,S., Yager,D., Slunt,H.H., Wang,R., Seeger,M., Levey,A.I., Gandy,S.E., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., Price,D.L., Younkin,S.G., and Sisodia,S.S. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 17, 1005-1013.

Boyles,J.K., Zoellner,C.D., Anderson,L.J., Kosik,L.M., Pitas,R.E., Weisgraber,K.H., Hui,D.Y., Mahley,R.W., Gebicke-Haerter,P.J., Ignatius,M.J., and . (1989). A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J Clin Invest*. 83, 1015-1031.

Braak,H. and Braak,E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82, 239-259.

Braak,H. and Braak,E. (1994). Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol Aging*. 15, 355-356.

Braak,H., Braak,E., Bohl,J., and Bratzke,H. (1998). Evolution of Alzheimer's disease related cortical lesions. *J Neural Transm.Suppl*. 54:97-106., 97-106.

Braulke,T. and Bonifacino,J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim.Biophys.Acta*. 1793, 605-614.

Bretteville A, Planel E. Tau aggregates: toxic, inert, or protective species? *J Alzheimers Dis*. 2008 Aug;14(4):431-6.

Buée L, Bussi re T, Bu e-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR.Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Aug;33(1):95-130.

Burgin,K.E., Waxham,M.N., Rickling,S., Westgate,S.A., Mobley,W.C., and Kelly,P.T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci.* 10, 1788-1798.

Burns,M.P., Noble,W.J., Olm,V., Gaynor,K., Casey,E., LaFrancois,J., Wang,L., and Duff,K. (2003). Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res.* 110, 119-125.

Buttini,M., Orth,M., Bellosta,S., Akeefe,H., Pitas,R.E., Wyss-Coray,T., Mucke,L., and Mahley,R.W. (1999). Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of Apoe^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci.* 19, 4867-4880.

Buxbaum,J.D., Liu,K.N., Luo,Y., Slack,J.L., Stocking,K.L., Peschon,J.J., Johnson,R.S., Castner,B.J., Cerretti,D.P., and Black,R.A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 273, 27765-27767.

- C -

Caglayan,S., Takagi-Niidome,S., Liao,F., Carlo,A.S., Schmidt,V., Burgert,T., Kitago,Y., Fuchtbauer,E.M., Fuchtbauer,A., Holtzman,D.M., Takagi,J., and Willnow,T.E. (2014). Lysosomal sorting of amyloid-beta by the SORLA receptor is impaired by a familial Alzheimer's disease mutation. *Sci Transl Med.* 6, 223ra20.

Cai,D., Leem,J.Y., Greenfield,J.P., Wang,P., Kim,B.S., Wang,R., Lopes,K.O., Kim,S.H., Zheng,H., Greengard,P., Sisodia,S.S., Thinakaran,G., and Xu,H. (2003). Presenilin-1 regulates intracellular trafficking and cell surface delivery of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 278, 3446-3454.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Oct;8(10):766-75.

Calkins,M.J. and Reddy,P.H. (2011). Amyloid beta impairs mitochondrial anterograde transport and degenerates synapses in Alzheimer's disease neurons. *Biochim.Biophys.Acta.* 1812, 507-513.

Campion,D., Dumanchin,C., Hannequin,D., Dubois,B. , Belliard,S., Puel,M., Thomas-Anterion,C., Michon,A., Martin,C., Charbonnier,F., Raux,G., Camuzat,A., Penet,C., Mesnage,V., Martinez,M., Clerget-Darpoux,F., Brice,A., and Frebourg,T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.* 65, 664-670.

Capell,A., Kaether,C., Edbauer,D., Shirotani,K., Merkl,S., Steiner,H., and Haass,C. (2003). Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem.* 278, 52519-52523.

Caporaso,G.L., Gandy,S.E., Buxbaum,J.D., Ramabhadran,T.V., and Greengard,P. (1992). Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 89, 3055-3059.

Carro A, Bastiaenen R, Kaski JC. Cardiovascular disease in the elderly: comment. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012 Feb;65(2):196. doi: 10.1016/j.recesp.2011.09.003.

Carro,E., Trejo,J.L., Gomez-Isla,T., LeRoith,D., and Torres-Aleman,I. (2002). Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med.* 8, 1390-1397.

Castano,E.M., Prelli,F., Wisniewski,T., Golabek,A., Kumar,R.A., Soto,C., and Frangione,B. (1995). Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem J.* 306, 599-604. 50. Castellani,R.J., Lee,H.G., Zhu,X., Perry,G., and Smith,M.A. (2008). Alzheimer disease pathology as a host response. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67, 523-531.

Cataldo,A.M., Paskevich,P.A., Kominami,E., and Nixon,R.A. (1991). Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 88, 10998-11002.

Cavazos,J.E., Zhang,P., Qazi,R., and Sutula,T.P. (2003). Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. *J Comp Neurol.* 458, 272-292.

Cerretti,D.P., DuBose,R.F., Black,R.A., and Nelson,N. (1999). Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. *Biochem Biophys.Res Commun.* 263, 810-815.

Chantry,A. and Glynn,P. (1990). A novel metalloproteinase originally isolated from brain myelin membranes is present in many tissues. *Biochem J.* 268, 245-248.

Chapuis,J., Hansmannel,F., Gistelinc,M., Mounier,A., Van Cauwenberghe,C., Kolen,K.V., Geller,F., Sottejeau,Y., Harold,D., Dourlen,P., Grenier-Boley,B., Kamatani,Y., Delepine,B., Demiautte,F., Zelenika,D., Zommer,N., Hamdane,M., Bellenguez,C., Dartigues,J.F., Hauw,J.J., Letronne,F., Ayral,A.M., Sleegers,K., Schellens,A. , Broeck,L.V., Engelborghs,S., De Deyn,P.P., Vandenbergh,R., O'Donovan,M., Owen,M., Epelbaum,J., Mercken,M., Karran,E., Bantscheff,M., Drewes,G., Joberty,G., Campion,D., Octave,J.N., Berr,C., Lathrop,M., Callaerts,P., Mann,D., Williams,J., Buee,L., Dewachter,I., Van Broeckhoven,C., Amouyel,P., Moechars,D., Dermaut,B., and Lambert,J.C. (2013). Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry.* 18, 1225-1234.

Chen,F., Hasegawa,H., Schmitt-Ulms,G., Kawarai,T., Bohm,C., Katayama,T., Gu,Y., Sanjo,N., Glista,M., Rogaeva,E., Wakutani,Y., Pardossi-Piquard,R., Ruan,X., Tandon,A., Checler,F., Marambaud,P., Hansen,K., Westaway,D., George-Hyslop,P., and Fraser,P. (2006). TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature.* 440, 1208-1212.

Cheng,I.H., Searce-Levie,K., Legleiter,J., Palop,J.J., Gerstein,H., Bien-Ly,N., Puolivali,J., Lesne,S., Ashe,K.H., Muchowski,P.J., and Mucke,L. (2007). Accelerating amyloid-beta

fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem.* 282, 23818-23828.

Chiang HC, Wang L, Xie Z, Yau A, Zhong Y. PI3 kinase signaling is involved in A β -induced memory loss in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Apr 13;107(15):7060-5. doi: 10.1073/pnas.0909314107.

Cholerton B, Baker LD, Craft S. Insulin, cognition, and dementia. *Eur J Pharmacol.* 2013 Nov 5;719(1-3):170-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.08.008.

Chubb,C., Inagaki,Y., Sheu,P., Cummings,B., Wasserman,A., Head,E., and Cotman,C. (2006). BioVision: an application for the automated image analysis of histological sections. *Neurobiol Aging.* 27, 1462-1476.

Chun,D., Gall,C.M., Bi,X., and Lynch,G. (2001). Evidence that integrins contribute to multiple stages in the consolidation of long term potentiation in rat hippocampus. *Neuroscience.* 105, 815-829.

Cifuentes D, Poittevin M, Dere E, Broquères-You D, Bonnin P, Benessiano J, Pocard M, Mariani J, Kubis N, Merkulova-Rainon T, Lévy BI. Hypertension accelerates the progression of Alzheimer-like pathology in a mouse model of the disease. *Hypertension.* 2015 Jan;65(1):218-24. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04139.

Cleary,J.P., Walsh,D.M., Hofmeister,J.J., Shankar,G.M., Kuskowski,M.A., Selkoe,D.J., and Ashe,K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 8, 79-84.

Clegg,D.O., Wingerd,K.L., Hikita,S.T., and Tolhurst,E.C. (2003). Integrins in the development, function and dysfunction of the nervous system. *Front Biosci.* 8:d723-50, d723-d750.

Cobb,J.L., Wolf,P.A., Au,R., White,R., and D'Agostino,R.B. (1995). The effect of education on the incidence of dementia and Alzheimer's disease in the Framingham Study. *Neurology.* 45, 1707-1712.

Colciaghi,F., Borroni,B., Pastorino,L., Marcello,E., Zimmermann,M., Cattabeni,F., Padovani,A., and Di Luca,M. (2002). [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med.* 8, 67-74.

Cole SL, Vassar R. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem.* 2008 Oct 31;283(44):29621-5. doi: 10.1074/jbc.R800015200.

Corder,E.H., Saunders,A.M., Strittmatter,W.J., Schmechel,D.E., Gaskell,P.C., Small,G.W., Roses,A.D., Haines,J.L., and Pericak-Vance,M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261, 921-923.

Corder,E.H., Saunders,A.M., Risch,N.J., Strittmatter,W.J., Schmechel,D.E., Gaskell,P.C., Jr., Rimmler,J.B., Locke,P.A., Conneally,P.M., Schmechel,K.E., and . (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 7, 180-184.

Cordy,J.M., Hussain,I., Dingwall,C., Hooper,N.M., and Turner,A.J. (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 100, 11735-11740.

Correia SC, Santos RX, Carvalho C, Cardoso S, Candeias E, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI. Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria: major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation. *Brain Res.* 2012 Mar 2;1441:64-78. doi: 10.1016/j.brainres.2011.12.063.

Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* 2004 Mar;3(3):169-78.

Craft,S. (2007). Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment. *Curr Alzheimer Res.* 4, 147-152.

Crane PK, Walker R, Larson EB. Glucose levels and risk of dementia. *N Engl J Med.* 2013 Nov 7;369(19):1863-4. doi: 10.1056/NEJMc1311765.

Crehan,H., Holton,P., Wray,S., Pocock,J., Guerreiro,R., and Hardy,J. (2012). Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease. *Immunobiology.* 217, 244-250.

Crystal,A.S., Morais,V.A., Pierson,T.C., Pijak,D.S., Carlin,D., Lee,V.M., and Doms,R.W. (2003). Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2. *J Biol Chem.* 278, 20117-20123.

Crystal,H., Dickson,D., Fuld,P., Masur,D., Scott,R., Mehler,M., Masdeu,J., Kawas,C., Aronson,M., and Wolfson,L. (1988). Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology.* 38, 1682-1687.

Csiszar A, Tucsek Z, Toth P, Sosnowska D, Gautam T, Koller A, Deak F, Sonntag WE, Ungvari Z. Synergistic effects of hypertension and aging on cognitive function and hippocampal expression of genes involved in β -amyloid generation and Alzheimer's disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Oct 15;305(8):H1120-30. doi: 10.1152/ajpheart.00288.2013.

- D -

Dawson,G.R., Seabrook,G.R., Zheng,H., Smith,D.W., Graham,S., O'Dowd,G., Bowery,B.J., Boyce,S., Trumbauer,M.E., Chen,H.Y., Van der Ploeg,L.H., and Sirinathsinghji,D.J. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience.* 90, 1-13.

De Felice,F.G., Vieira,M.N., Bomfim,T.R., Decker,H., Velasco,P.T., Lambert,M.P., Viola,K.L., Zhao,W.Q., Ferreira,S.T., and Klein,W.L. (2009). Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 106, 1971-1976.

De Strooper,B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron.* 38, 9-12.

Deacon,R.M.J., Cholerton,L.L., Talbot,K., Nair-Roberts,R.G., Sanderson,D.J., Romberg,C., Koros,E., Bornemann,K.D., and Rawlings,J.N.P. (2007). Age-dependent and –independent behavioral deficits in Tg2576 mice.

Deane,R., Wu,Z., and Zlokovic,B.V. (2004). RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 35, 2628-2631.

Deane,R., Sagare,A., Hamm,K., Parisi,M., Lane,S., Finn,M.B., Holtzman,D.M., and Zlokovic,B.V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*. 118, 4002-4013.

Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buée L, Wattez A, Vermersch P, Ghzali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999 Apr 12;52(6):1158-65.

Delacourte A, Buée L. Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol*. 2000 Aug;13(4):371-6.

Delacourte A, Sergeant N, Wattez A, Maurage CA, Lebert F, Pasquier F, David JP. Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Exp Gerontol*. 2002 Oct-Nov;37(10-11):1291-6. DeMattos,R.B., Cirrito,J.R., Parsadanian,M., May,P.C., O'Dell,M.A., Taylor,J.W., Harmony,J.A., Aronow,B.J., Bales,K.R., Paul,S.M., and Holtzman,D.M. (2004). ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron*. 41, 193-202.

De la Monte SM, Longato L, Tong M, Wands JR. Insulin resistance and neurodegeneration: roles of obesity, type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Oct;10(10):1049-60.

De la Monte SM. Contributions of brain insulin resistance and deficiency in amyloid-related neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Drugs*. 2012 Jan 1;72(1):49-66. doi: 10.2165/11597760-000000000-00000.

De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2010 Feb;6(2):99-107. doi:10.1038/nrneurol.2009.218. Dreyer,R.N., Bausch,K.M., Fracasso,P., Hammond,L.J., Wunderlich,D., Wirak,D.O., Davis,G., Brini,C.M., Buckholz,T.M., Konig,G., and . (1994). Processing of the pre-beta-amyloid protein by cathepsin D is enhanced by a familial Alzheimer's disease mutation. *Eur J Biochem*. 224, 265-271.

Devi,L., Prabhu,B.M., Galati,D.F., Avadhani,N.G. , and Anandatheerthavarada,H.K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 26, 9057-9068.

Devi,L. and Ohno,M. (2012). Mitochondrial dysfunction and accumulation of the beta-secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 45, 417-424.

Diaz-Rodriguez,E., Montero,J.C., Esparis-Ogando,A., Yuste,L., and Pandiella,A. (2002). Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell.* 13, 2031-2044.

Dice,J.F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* 3, 295-299.

Dickson,T.C., Saunders,H.L., and Vickers,J.C. (1997). Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl.Neurobiol.* 23, 483-491.

Donners,M.M., Wolfs,I.M., Olieslagers,S., Mohammadi-Motahhari,Z., Tchaikovski,V., Heeneman,S., van Buul,J.D., Caolo,V., Molin,D.G., Post,M.J., and Waltenberger,J. (2010). A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30, 2188-2195.

Dorr,A.E., Lerch,J.P., Spring,S., Kabani,N., and Henkelman,R.M. (2008). High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *Neuroimage.* 42, 60-69.

Du,J., Chang,J., Guo,S., Zhang,Q., and Wang,Z. (2009). ApoE 4 reduces the expression of Abeta degrading enzyme IDE by activating the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 464, 140-145.

Dubois,A., Herard,A.S., Flandin,G., Duchesnay,E., Besret,L., Frouin,V., Hantraye,P., Bonvento,G., and Delzescaux,T. (2008). Quantitative validation of voxel-wise statistical analyses of autoradiographic rat brain volumes: application to unilateral visual stimulation. *Neuroimage.* 40, 482-494

- E -

EClipSE Collaborative Members, Brayne C, Ince PG, Keage HA, McKeith IG, Matthews FE, Polvikoski T, Sulkava R. Education, the brain and dementia: neuroprotection or compensation? *Brain.* 2010 Aug;133(Pt 8):2210-6. doi: 10.1093/brain/awq185.

Edwards,D.R., Handsley,M.M., and Pennington,C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 29, 258-289.

Ehehalt,R., Michel,B., De Pietri,T.D., Zacchetti,D., Simons,K., and Keller,P. (2002). Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochem Biophys.Res Commun.* 293, 30-37.

Elshourbagy,N.A., Liao,W.S., Mahley,R.W., and Taylor,J.M. (1985). Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 82, 203-207.

Endres,K., Anders,A., Kojro,E., Gilbert,S., Fahrenholz,F., and Postina,R. (2003). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem.* 270, 2386-2393.

Erol A. An integrated and unifying hypothesis for the metabolic basis of sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008 Apr;13(3):241-53.

Esch,F.S., Keim,P.S., Beattie,E.C., Blacher,R.W. , Culwell,A.R., Oltersdorf,T., McClure,D., and Ward,P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 248, 1122-1124.

Ewers,M., Zhong,Z., Burger,K., Wallin,A., Blennow,K., Teipel,S.J., Shen,Y., and Hampel,H. (2008). Increased CSF-BACE 1 activity is associated with ApoE-epsilon 4 genotype in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain.* 131, 1252-1258.

- F -

Fabrigoule,C., Letenneur,L., Dartigues,J.F., Zarrouk,M., Commenges,D., and Barberger-Gateau,P. (1995). Social and leisure activities and risk of dementia: a prospective longitudinal study. *J Am Geriatr Soc.* 43, 485-490.

Falkevall,A., Alikhani,N., Bhushan,S., Pavlov,P.F., Busch,K., Johnson,K.A., Eneqvist,T., Tjernberg,L., Ankarcrona,M., and Glaser,E. (2006). Degradation of the amyloid beta-protein by the novel mitochondrial peptidosome, PreP. *J Biol Chem.* 281, 29096-29104.

Fambrough,D., Pan,D., Rubin,G.M., and Goodman,C.S. (1996). The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in *Drosophila*. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 93, 13233-13238.

Fantin,V.R., Lavan,B.E., Wang,Q., Jenkins,N.A., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Keller,S.R., and Lienhard,G.E. (1999). Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology.* 140, 1329-1337.

Fantin,V.R., Sparling,J.D., Slot,J.W., Keller,S.R., Lienhard,G.E., and Lavan,B.E. (1998). Characterization of insulin receptor substrate 4 in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem.* 273, 10726-10732.

Farrer,L.A., Cupples,L.A., Haines,J.L., Hyman,B., Kukull,W.A., Mayeux,R., Myers,R.H., Pericak-Vance,M.A., Risch,N., and van Duijn,C.M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 278, 1349-1356.

Farris,W., Mansourian,S., Chang,Y., Lindsley,L., Eckman,E.A., Frosch,M.P., Eckman,C.B., Tanzi,R.E., Selkoe,D.J., and Guenette,S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 100, 4162-4167.

Farzan,M., Schnitzler,C.E., Vasilieva,N., Leung,D., and Choe,H. (2000). BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 97, 9712-9717.

Fassbender,K., Simons,M., Bergmann,C., Stroick,M., Lutjohann,D., Keller,P., Runz,H., Kuhl,S., Bertsch,T., von Bergmann,K., Hennerici,M., Beyreuther,K., and Hartmann,T. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo . *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 98, 5856-5861.

Ferrari C, Nacmias B, Bagnoli S, Piaceri I, Lombardi G, Pradella S, Tedde A, Sorbi S. Imaging and cognitive reserve studies predict dementia in presymptomatic Alzheimer's disease subjects. *Neurodegener Dis.* 2014;13(2-3):157-9. doi: 10.1159/000353690.

Fewlass,D.C., Noboa,K., Pi-Sunyer,F.X., Johnston,J.M., Yan,S.D., and Tezapsidis,N. (2004). Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J.* 18, 1870-1878.

Filali,M. and Lalonde,R. (2009). Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1292, 93-9.

Fiore,F., Zambrano,N., Minopoli,G., Donini,V., Duilio,A., and Russo,T. (1995). The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 270, 30853-30856.

Firbank MJ, Blamire AM, Krishnan MS, Teodorczuk A, English P, Gholkar A, Harrison R, O'Brien JT. Atrophy is associated with posterior cingulate white matter disruption in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Neuroimage.* 2007 May 15;36(1):1-7.

Fjorback,A.W. and Andersen,O.M. (2012). SorLA is a molecular link for retromer-dependent sorting of the Amyloid precursor protein. *Commun.Integr.Biol.* 5, 616-619.

Folstein,M.F., Folstein,S.E., and McHugh,P.R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr.Res.* 12, 189-198.

Fortna,R.R., Crystal,A.S., Morais,V.A., Pijak,D.S., Lee,V.M., and Doms,R.W. (2004). Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the gamma-secretase complex. *J Biol Chem.* 279, 3685-3693.

Fraering,P.C., LaVoie,M.J., Ye,W., Ostaszewski,B.L., Kimberly,W.T., Selkoe,D.J., and Wolfe,M.S. (2004). Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry.* 43, 323-333.

Fraering,P.C., Ye,W., Strub,J.M., Dolios,G., LaVoie,M.J., Ostaszewski,B.L., van Dorsselaer,A., Wang,R., Selkoe,D.J., and Wolfe,M.S. (2004). Purification and characterization of the human gamma-secretase complex. *Biochemistry*. 43, 9774-9789.

Fratiglioni,L., Paillard-Borg,S., and Winblad,B. (2004). An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol*. 3 , 343-353.

Fratiglioni,L., Launer,L.J., Andersen,K., Breteler,M.M., Copeland,J.R., Dartigues,J.F., Lobo,A., Martinez-Lage,J., Soininen,H., and Hofman,A. (2000). Incidence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology*. 54, S10-S15.

Freude S, Schilbach K, Schubert M. The role of IGF-1 receptor and insulin receptor signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: from model organisms to human disease. *Curr Alzheimer Res*. 2009 Jun;6(3):213-23.

Frisoni,G.B., Bocchetta,M., Chetelat,G., Rabinovici,G.D., de Leon,M.J., Kaye,J., Reiman,E.M., Scheltens,P., Barkhof,F., Black,S.E., Brooks,D.J., Carrillo,M.C., Fox,N.C., Herholz,K., Nordberg,A., Jack,C.R., Jr., Jagust,W.J., Johnson,K.A., Rowe,C.C., Sperling,R.A., Thies,W., Wahlund,L.O., Weiner,M.W., Pasqualetti,P., and Decarli,C. (2013). Imaging markers for Alzheimer disease: which vs how. *Neurology*. 81, 487-500.

Frisoni,G.B., Fox,N.C., Jack,C.R., Jr., Scheltens,P., and Thompson,P.M. (2010). The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 6, 67-77.

Fukumori,A., Fluhrer,R., Steiner,H., and Haass,C. (2010). Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *J Neurosci*. 30, 7853-7862.

Fusek,M. and Vetvicka,V. (2005). Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed.Pap.Med Fac.Univ Palacky.Olomouc.Czech.Repub*. 149, 43-50.

Fusek,M., Baudys,M., and Metcalf,P. (1992). Purification and crystallization of human cathepsin D. *J Mol Biol*. 226, 555-557.

- G -

Gatz,M., Reynolds,C.A., Fratiglioni,L., Johansson,B., Mortimer,J.A., Berg,S., Fiske,A., and Pedersen,N.L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen.Psychiatry*. 63, 168-174.

Gaultier,A., Cousin,H., Darribere,T., and Alfandari,D. (2002). ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *J Biol Chem*. 277, 23336-23344.

Gentile MT, Poulet R, Di Pardo A, Cifelli G, Maffei A, Vecchione C, Passarelli F, Landolfi A, Carullo P, Lembo G. Beta-amyloid deposition in brain is enhanced in mouse models of arterial hypertension. *Neurobiol Aging*. 2009 Feb;30(2):222-8.

Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol.* 2013 Feb;47(1):145-71. doi: 10.1007/s12035-012-8339-9.

Geula,C., Wu,C.K., Saroff,D., Lorenzo,A., Yuan,M., and Yankner,B.A. (1998). Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med.* 4, 827-831.

Goate A, Hardy J. Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations. *J Neurochem.* 2012 Jan;120 Suppl 1:3-8. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07575.x.

Goedert,M., Spillantini,M.G., Potier,M.C., Ulrich,J., and Crowther,R.A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 8, 393-399.

Golde,T.E., Estus,S., Usiak,M., Younkin,L.H., and Younkin,S.G. (1990). Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron.* 4, 253-267.

Gomis-Ruth,F.X. (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol.* 24, 157-202.

Gonzales,P.E., Solomon,A., Miller,A.B., Leesnitzer,M.A., Sagi,I., and Milla,M.E. (2004). Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain. *J Biol Chem.* 279, 31638-31645.

Gotz,J., Chen,F., van Dorpe,J., and Nitsch,R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science.* 293, 1491-1495.

Gotz,J., Chen,F., Barmettler,R., and Nitsch,R.M. (2001). Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem.* 276, 529-534.

Gralle M, Ferreira ST. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts. *Prog Neurobiol.* 2007 May;82(1):11-32.

Greco,S.J., Sarkar,S., Johnston,J.M., Zhu,X., Su,B., Casadesus,G., Ashford,J.W., Smith,M.A., and Tezapsidis,N. (2008). Leptin reduces Alzheimer's disease-related tau phosphorylation in neuronal cells. *Biochem Biophys.Res Commun.* 376, 536-541.

Greco,S.J., Sarkar,S., Johnston,J.M., and Tezapsidis,N. (2009). Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells. *Biochem Biophys.Res Commun.* 380, 98-104.

Grober,E., Buschke,H., Crystal,H., Bang,S., and Dresner,R. (1988). Screening for dementia by memory testing. *Neurology.* 38, 900-903.

Gruninger-Leitch,F., Schlatter,D., Kung,E., Nelbock,P., and Dobeli,H. (2002). Substrate and inhibitor profile of BACE (beta-secretase) and comparison with other mammalian aspartic proteases. *J Biol Chem.* 277, 4687-4693.

Gu,Y., Nieves,J.W., Stern,Y., Luchsinger,J.A., and Scarmeas,N. (2010). Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. *Arch Neurol.* 67, 699-706.

Guerreiro RJ, Baquero M, Blesa R, Boada M, Brás JM, Bullido MJ, Calado A, Crook R, Ferreira C, Frank A, Gómez-Isla T, Hernández I, Lleó A, Machado A, Martínez-Lage P, Masdeu J, Molina-Porcel L, Molinuevo JL, Pastor P, Pérez-Tur J, Relvas R, Oliveira CR, et al. Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiol Aging.* 2010 May;31(5):725-31. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.06.012.

Guglielmotto,M., Tamagno,E., and Danni,O. (2009). Oxidative stress and hypoxia contribute to Alzheimer's disease pathogenesis: two sides of the same coin. *ScientificWorldJournal.* 9:781-91. doi: 10.1100/tsw.2009.93., 781-791.

Guglielmotto,M., Aragno,M., Autelli,R., Giliberto,L., Novo,E., Colombatto,S., Danni,O., Parola,M., Smith,M.A., Perry,G., Tamagno,E. , and Tabaton,M. (2009). The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1alpha. *J Neurochem.* 108, 1045-1056.

Gustafson DR, Bäckman K, Waern M, Ostling S, Guo X, Zandi P, Mielke MM, Bengtsson C, Skoog I. Adiposity indicators and dementia over 32 years in Sweden.*Neurology.* 2009 Nov 10;73(19):1559-66. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c0d4b6.

- H -

Haas,J., Storch-Hagenlocher,B., Biessmann,A., and Wildemann,B. (2002). Inducible nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase: co-induction in brain tissue of patients with Alzheimer's dementia and following stimulation with beta-amyloid 1-42 in vitro. *Neurosci Lett.* 322, 121-125.

Hall,D. and Edskes,H. (2012). Computational modeling of the relationship between amyloid and disease. *Biophys.Rev.* 4, 205-222.

Ham,C., Levkau,B., Raines,E.W., and Herren,B. (2002). ADAM15 is an adherens junction molecule whose surface expression can be driven by VE-cadherin. *Exp Cell Res.* 279, 239-247.

Hampel,H., Wilcock,G., Andrieu,S., Aisen,P., Blennow,K., Broich,K., Carrillo,M., Fox,N.C., Frisoni,G.B., Isaac,M., Lovestone,S., Nordberg,A., Prvulovic,D., Sampaio,C., Scheltens,P., Weiner,M., Winblad,B., Coley,N., and Vellas,B. (2011). Biomarkers for Alzheimer's disease therapeutic trials. *Prog.Neurobiol.* 95, 579-593.

Hanger,D.P., Betts,J.C., Loviny,T.L., Blackstock,W.P., and Anderton,B.H. (1998). New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J Neurochem.* 71, 2465-2476.

Haniu,M., Denis,P., Young,Y., Mendiaz,E.A., Fuller,J., Hui,J.O., Bennett,B.D., Kahn,S., Ross,S., Burgess,T., Katta,V., Rogers,G., Vassar,R., and Citron,M. (2000). Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem.* 275, 21099-21106.

Hansson,O., Zetterberg,H., Buchhave,P., Andreasson,U., Londos,E., Minthon,L., and Blennow,K. (2007). Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Abeta42/Abeta40 ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 23, 316-320.

Haque,A., Banik,N.L., and Ray,S.K. (2008). New insights into the roles of endolysosomal cathepsins in the pathogenesis of Alzheimer's disease: cathepsin inhibitors as potential therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 7, 270-277.

Hardy,J.A. and Higgins,G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256, 184-185.

Hardy J, Selkoe DJ.The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353-6.

Harold,D., Jehu,L., Turic,D., Hollingworth,P., Moore,P., Summerhayes,P., Moskva,V., Foy,C., Archer,N., Hamilton,B.A., Lovestone,S., Powell,J., Brayne,C., Rubinsztein,D.C., Jones,L., O'Donovan,M.C., Owen,M.J., and Williams,J. (2007). Interaction between the ADAM12 and SH3MD1 genes may confer susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr.Genet.* 144B, 448-452.

Harold,D., Abraham,R., Hollingworth,P., Sims,R., Gerrish,A., Hamshere,M.L., Pahwa,J.S., Moskva,V., Dowzell,K., Williams,A., Jones,N., Thomas,C., Stretton,A., Morgan,A.R., Lovestone,S., Powell,J., Proitsi,P., Lupton,M.K., Brayne,C., Rubinsztein,D.C., Gill,M., Lawlor,B., Lynch,A., Morgan,K., Brown,K.S., Passmore,P.A., Craig,D. , McGuinness,B., Todd,S., Holmes,C., Mann,D., Smith,A.D., Love,S., Kehoe,P.G., Hardy,J., Mead,S., Fox,N., Rossor,M., Collinge,J., Maier,W., Jessen,F., Schurmann,B., Heun,R., van den,B.H., Heuser,I., Kornhuber,J., Wiltfang,J., Dichgans,M., Frolich,L., Hampel,H., Hull,M., Rujescu,D., Goate,A.M., Kauwe,J.S., Cruchaga,C., Nowotny,P., Morris,J.C., Mayo,K., Sleegers,K., Bettens,K., Engelborghs,S., De Deyn,P.P., Van Broeckhoven,C., Livingston,G., Bass,N.J., Gurling,H., McQuillin,A., Gwilliam,R., Deloukas,P., Al Chalabi,A., Shaw,C.E., Tsolaki,M., Singleton,A.B., Guerreiro,R., Muhleisen,T.W., Nothen,M.M., Moebus,S., Jockel,K.H., Klopp,N., Wichmann,H.E., Carrasquillo,M.M., Pankratz,V.S., Younkin,S.G., Holmans,P.A., O'Donovan,M., Owen,M.J., and Williams,J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41, 1088-1093.

Hartman,R.E., Laurer,H., Longhi,L., Bales,K.R., Paul,S.M., McIntosh,T.K., and Holtzman,D.M. (2002). Apolipoprotein E4 influences amyloid deposition but not cell loss after traumatic brain injury in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22, 10083-10087.

Hermes,J., Anliker,B., Heber,S., Ring,S., Fuhrmann,M., Kretschmar,H., Sisodia,S., and Muller,U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 23, 4106-4115.

Herskowitz,J.H., Offe,K., Deshpande,A., Kahn,R.A., Levey,A.I., and Lah,J.J. (2012). GGA1-mediated endocytic traffic of LR11/SorLA alters APP intracellular distribution and amyloid-beta production. *Mol Biol Cell.* 23, 2645-2657.

Hinsby,A.M., Olsen,J.V., and Mann,M. (2004). Tyrosine phosphoproteomics of fibroblast growth factor signaling: a role for insulin receptor substrate-4. *J Biol Chem.* 279, 46438-46447.

Hitt,B.D., Jaramillo,T.C., Chetkovich,D.M., and Vassar,R. (2010). BACE1-/- mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Mol Neurodegener.* 5:31. doi: 10.1186/1750-1326-5-31., 31-35.

Ho,M.M., Yoganathan,P., Chu,K.Y., Karunakaran,S. , Johnson,J.D., and Clee,S.M. (2013). Diabetes genes identified by genome-wide association studies are regulated in mice by nutritional factors in metabolically relevant tissues and by glucose concentrations in islets. *BMC Genet.* 14:10. doi: 10.1186/1471-2156-14-10., 10-14.

Holler CJ, Webb RL, Laux AL, Beckett TL, Niedowicz DM, Ahmed RR, Liu Y, Simmons CR, Dowling AL, Spinelli A, Khurgel M, Estus S, Head E, Hersh LB, Murphy MP. BACE2 expression increases in human neurodegenerative disease. *Am J Pathol.* 2012 Jan;180(1):337-50. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.034. Epub 2011 Nov 7.

Hollingworth,P., Harold,D., Sims,R., Gerrish,A., Lambert,J.C., Carrasquillo,M.M., Abraham,R., Hamshere,M.L., Pahwa,J.S., Moskvina,V., Dowzell,K., Jones,N., Stretton,A., Thomas,C., Richards,A., Ivanov,D., Widdowson,C., Chapman,J., Lovestone,S., Powell,J., Proitsi,P., Lupton,M.K., Brayne,C., Rubinsztein,D.C., Gill,M., Lawlor,B., Lynch,A., Brown,K.S., Passmore,P.A., Craig,D., McGuinness,B., Todd,S., Holmes,C., Mann,D., Smith,A.D., Beaumont,H., Warden,D., Wilcock,G., Love,S., Kehoe,P.G., Hooper,N.M., Vardy,E.R., Hardy,J., Mead,S., Fox,N.C., Rossor,M., Collinge,J., Maier,W., Jessen,F., Ruther,E., Schurmann,B., Heun,R., Kolsch,H., van den,B.H., Heuser,I., Kornhuber,J., Wiltfang,J., Dichgans,M., Frolich,L., Hampel,H., Gallacher,J., Hull,M., Rujescu,D., Giegling,I., Goate,A.M., Kauwe,J.S., Cruchaga,C., Nowotny,P., Morris,J.C., Mayo,K., Sleegers,K., Bettens,K., Engelborghs,S., De Deyn,P.P., Van Broeckhoven,C., Livingston,G., Bass,N.J., Gurling,H., McQuillin,A., Gwilliam,R., Deloukas,P., Al Chalabi,A., Shaw,C.E., Tsolaki,M., Singleton,A.B., Guerreiro,R., Muhleisen,T.W., Nothen,M.M., Moebus,S., Jockel,K.H., Klopp,N., Wichmann,H.E., Pankratz,V.S., Sando,S.B., Aasly,J.O., Barcikowska,M., Wszolek,Z.K., Dickson,D.W., Graff-Radford,N.R., Petersen,R.C., van Duijn,C.M., Breteler,M.M., Ikram,M.A., DeStefano,A.L., Fitzpatrick,A.L., Lopez,O., Launer,L.J., Seshadri,S., Berr,C., Champion,D., Epelbaum,J., Dartigues,J.F., Tzourio,C., Alperovitch,A., Lathrop,M., Feulner,T.M., Friedrich,P., Riehle,C., Krawczak,M., Schreiber,S., Mayhaus,M., Nicolhaus,S., Wagenpfeil,S., Steinberg,S., Stefansson,H., Stefansson,K., Snaedal,J., Bjornsson,S., Jonsson,P.V., Chouraki,V., Genier-Boley,B., Hiltunen,M., Soininen,H., Combarros,O., Zelenika,D., Delepine,M., Bullido,M.J., Pasquier,F., Mateo,I., Frank-Garcia,A., Porcellini,E., Hanon,O., Coto,E., Alvarez,V., Bosco,P., Siciliano,G., Mancuso,M., Panza,F., Solfrizzi,V., Nacmias,B., Sorbi,S., Bossu,P., Piccardi,P., Arosio,B., Annoni,G. , Seripa,D., Pilotto,A., Scarpini,E., Galimberti,D., Brice,A., Hannequin,D., Licastro,F., Jones,L., Holmans,P.A., Jonsson,T., Riemenschneider,M., Morgan,K., Younkin,S.G., Owen,M.J., O'Donovan,M., Amouyel,P., and Williams,J. (2011). Common variants at ABCA7,

MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 43, 429-435.

Holroyd CB, Yeung N. Alcohol and error processing. *Trends Neurosci.* 2003 Aug;26(8):402-4.

Hook,V., Schechter,I., Demuth,H.U., and Hook,G. (2008). Alternative pathways for production of beta-amyloid peptides of Alzheimer's disease. *Biol Chem.* 389, 993-1006.

Hook,V., Toneff,T., Bogyo,M., Greenbaum,D., Medzihradszky,K.F., Neveu,J., Lane,W., Hook,G., and Reisine,T. (2005). Inhibition of cathepsin B reduces beta-amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate beta-secretase of Alzheimer's disease . *Biol Chem.* 386, 931-940.

Hook,V.Y., Toneff,T., Aaron,W., Yasothornsrikul,S., Bunday,R., and Reisine,T. (2002). Beta-amyloid peptide in regulated secretory vesicles of chromaffin cells: evidence for multiple cysteine proteolytic activities in distinct pathways for beta-secretase activity in chromaffin vesicles. *J Neurochem.* 81, 237-256.

Hook,V.Y., Kindy,M., and Hook,G. (2008). Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce beta-amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, beta-secretase site of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 283, 7745-7753.

Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S. Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci.* 2006 Jun;23(12):3375-84.

Howard,L., Lu,X., Mitchell,S., Griffiths,S., and Glynn,P. (1996). Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *Biochem J.* 317, 45-50.

Howard,L., Maciewicz,R.A., and Blobel,C.P. (2000). Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem J.* 348 Pt 1:21-7., 21-27.

Hu,C., Zhang,R., Wang,C., Wang,J., Ma,X., Lu,J., Qin,W., Hou,X., Wang,C., Bao,Y., Xiang,K., and Jia,W. (2009). PPARG, KCNJ11, CDKAL1, CDKN2A-CDKN2B, IDE-KIF11-HHEX, IGF2BP2 and SLC30A8 are associated with type 2 diabetes in a Chinese population. *PLoS One.* 4, e7643.

Huang,Y., Weisgraber,K.H., Mucke,L., and Mahley,R.W. (2004). Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 23, 189-204.

Hung,A.Y., Haass,C., Nitsch,R.M., Qiu,W.Q., Citron,M., Wurtman,R.J., Growdon,J.H., and Selkoe,D.J. (1993). Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem.* 268, 22959-22962.

Hunt,C.E. and Turner,A.J. (2009). Cell biology, regulation and inhibition of beta-secretase (BACE-1). *FEBS J.* 276, 1845-1859.

Hutton,M. and Hardy,J. (1997). The presenilins and Alzheimer's disease . Hum Mol Genet. 6, 1639-1646.

Hutton,M., Lendon,C.L., Rizzu,P., Baker,M., Froelich,S., Houlden,H., Pickering-Brown,S., Chakraverty,S., Isaacs,A., Grover,A., Hackett,J., Adamson,J., Lincoln,S., Dickson,D., Davies,P., Petersen,R.C., Stevens,M., de Graaff,E., Wauters,E., van Baren,J., Hillebrand,M., Joosse,M., Kwon,J.M., Nowotny,P., Che,L.K., Norton,J., Morris,J.C., Reed,L.A., Trojanowski,J., Basun,H., Lannfelt,L., Neystat,M., Fahn,S., Dark,F., Tannenberg,T., Dodd,P.R., Hayward,N., Kwok,J.B., Schofield,P.R., Andreadis,A., Snowden,J. , Craufurd,D., Neary,D., Owen,F., Oostra,B.A., Hardy,J., Goate,A., van Swieten,J., Mann,D., Lynch,T., and Heutink,P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature. 393, 702-705.

Huxley-Jones,J., Clarke,T.K., Beck,C., Toubaris,G., Robertson,D.L., and Boot-Handford,R.P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. BMC Evol.Biol. 7:63., 63.

- I - J -

Iqbal,K., Alonso,A.C., Chen,S., Chohan,M.O., El Akkad,E., Gong,C.X., Khatoon,S., Li,B., Liu,F., Rahman,A., Tanimukai,H., and Grundke-Iqbal,I. (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. Biochim.Biophys.Acta. 1739, 198-210.

Ittner,L.M., Ke,Y.D., Delerue,F., Bi,M., Gladbach,A., van Eersel,J., Wolfing,H., Chieng,B.C., Christie,M.J., Napier,I.A., Eckert,A., Staufenbiel,M., Hardeman,E., and Gotz,J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. Cell. 142, 387-397.

Iwatsubo,T., Mann,D.M., Odaka,A., Suzuki,N., and Ihara,Y. (1995). Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome. Ann Neurol. 37, 294-299.

Janes,P.W., Saha,N., Barton,W.A., Kolev,M.V., Wimmer-Kleikamp,S.H., Nievergall,E., Blobel,C.P., Himanen,J.P., Lackmann,M., and Nikolov,D.B. (2005). Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. Cell. 123, 291-304.

Jankowsky,J.L., Fadale,D.J., Anderson,J., Xu,G.M., Gonzales,V., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Lee,M.K., Younkin,L.H., Wagner,S.L., Younkin,S.G., and Borchelt,D.R. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. Hum Mol Genet. 13, 159-170.

Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC.Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. Diabetes. 2004 Feb;53(2):474-81.

Jarvik,G.P., Wijsman,E.M., Kukull,W.A., Schellenberg,G.D., Yu,C., and Larson,E.B. (1995). Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology*. 45, 1092-1096.

Jellinger,K.A. (2006). Clinicopathological analysis of dementia disorders in the elderly--an update. *J Alzheimers Dis*. 9, 61-70.

Jellinger KA. The pathology of "vascular dementia": a critical update. *J Alzheimers Dis*. 2008 May;14(1):107-23.

Jiang,Q., Lee,C.Y., Mandrekar,S., Wilkinson,B. , Cramer,P., Zelcer,N., Mann,K., Lamb,B., Willson,T.M., Collins,J.L., Richardson,J.C. , Smith,J.D., Comery,T.A., Riddell,D., Holtzman,D.M., Tontonoz,P., and Landreth,G.E. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*. 58, 681-693.

Johnson-Wood,K., Lee,M., Motter,R., Hu,K., Gordon,G., Barbour,R., Khan,K., Gordon,M., Tan,H., Games,D., Lieberburg,I., Schenk,D., Seubert,P., and McConlogue,L. (1997). Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*. 94, 1550-1555.

Jolival,C.G., Lee,C.A., Beiswenger,K.K., Smith,J.L., Orlov,M., Torrance,M.A., and Masliah,E. (2008). Defective insulin signaling pathway and increased glycogen synthase kinase-3 activity in the brain of diabetic mice: parallels with Alzheimer's disease and correction by insulin . *J Neurosci Res*. 86, 3265-3274.

Jonsson,T., Atwal,J.K., Steinberg,S., Snaedal,J., Jonsson,P.V., Bjornsson,S., Stefansson,H., Sulem,P., Gudbjartsson,D., Maloney,J., Hoyte,K., Gustafson,A., Liu,Y., Lu,Y., Bhangale,T., Graham,R.R., Huttenlocher,J., Bjornsdottir,G., Andreassen,O.A., Jonsson,E.G., Palotie,A., Behrens,T.W., Magnusson,O.T., Kong,A., Thorsteinsdottir,U., Watts,R.J., and Stefansson,K. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 488, 96-99.

Jorm,A.F. (2000). Is depression a risk factor for dementia or cognitive decline? A review. *Gerontology*. 46, 219-227.

Jorm,A.F., Rodgers,B., Henderson,A.S., Korten,A.E., Jacomb,P.A., Christensen,H., and Mackinnon,A. (1998). Occupation type as a predictor of cognitive decline and dementia in old age. *Age Ageing*. 27, 477-483.

- K -

Kaether,C., Capell,A., Edbauer,D., Winkler,E., Novak,B., Steiner,H., and Haass,C. (2004). The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity. *EMBO J*. 23, 4738-4748.

Kang,J. and Muller-Hill,B. (1990). Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys.Res Commun*. 166, 1192-1200.

Kang,J., Lemaire,H.G., Unterbeck,A., Salbaum,J.M., Masters,C.L., Grzeschik,K.H., Multhaup,G., Beyreuther,K., and Muller-Hill,B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 325, 733-736.

Karas,M., Koval,A.P., Zick,Y., and LeRoith,D. (2001). The insulin-like growth factor I receptor-induced interaction of insulin receptor substrate-4 and Crk-II. *Endocrinology*. 142, 1835-1840.

KIDD,M. (1964). ALZHEIMER'S DISEASE--AN ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY. *Brain*. 87:307-20., 307-320.

KIDD,M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*. 197:192-3., 192-193.

Killick,R., Scales,G., Leroy,K., Causevic,M., Hooper,C., Irvine,E.E., Choudhury,A.I., Drinkwater,L., Kerr,F., Al Qassab,H., Stephenson,J., Yilmaz,Z., Giese,K.P., Brion,J.P., Withers,D.J., and Lovestone,S. (2009). Deletion of Irs2 reduces amyloid deposition and rescues behavioural deficits in APP transgenic mice. *Biochem Biophys. Res Commun*. 386, 257-262.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ*. 2001 Jun 16;322(7300):1447-51.

Klein,DM., Felsenstein, KM., and Brenneman,DE. (2009). Cathepsin B and L differentially regulate amyloid precursor protein processing. *J Pharmacol Exp Ther*. 328, 813-21.

Kling MA, Trojanowski JQ, Wolk DA, Lee VM, Arnold SE. Vascular disease and dementias: paradigm shifts to drive research in new directions. *Alzheimers Dement*. 2013 Jan;9(1):76-92. doi: 10.1016/j.jalz.2012.02.007.

Klionsky,D.J., Baehrecke,E.H., Brumell,J.H., Chu,C.T., Codogno,P., Cuervo,A.M., Debnath,J., Deretic,V., Elazar,Z., Eskelinen,E.L., Finkbeiner,S., Fuego-Margareto,J., Gewirtz,D., Jaattela,M., Kroemer,G., Levine,B., Melia,T.J., Mizushima,N., Rubinsztein,D.C., Simonsen,A., Thorburn,A., Thumm,M., and Tooze,S.A. (2011). A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy*. 7, 1273-1294.

Koike,H., Tomioka,S., Sorimachi,H., Saido,T.C., Maruyama,K., Okuyama,A., Fujisawa-Sehara,A., Ohno,S., Suzuki,K., and Ishiura,S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*. 343 Pt 2:371-5., 371-375.

Kojro,E., Postina,R., Buro,C., Meiringer,C., Gehrig-Burger,K., and Fahrenholz,F. (2006). The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB J*. 20, 512-514.

Kojro,E., Gimpl,G., Lammich,S., Marz,W., and Fahrenholz,F. (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*. 98, 5815-5820.

Korade,Z. and Kenworthy,A.K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*. 55, 1265-1273.

Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev*. 2009 Dec;14(4):373-9.

Kouchi,Z., Kinouchi,T., Sorimachi,H., Ishiura,S. , and Suzuki,K. (1998). The deletion of the C-terminal tail and addition of an endoplasmic reticulum targeting signal to Alzheimer's amyloid precursor protein change its localization, secretion, and intracellular proteolysis. *Eur J Biochem*. 258, 291-300.

Kouchi,Z., Sorimachi,H., Suzuki,K., and Ishiura,S. (1999). Proteasome inhibitors induce the association of Alzheimer's amyloid precursor protein with Hsc73. *Biochem Biophys.Res Commun*. 254, 804-810.

Kuhn,P.H., Wang,H., Dislich,B., Colombo,A., Zeitschel,U., Ellwart,J.W., Kremmer,E., Rossner,S., and Lichtenthaler,S.F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. 29, 3020-3032.

Kunz,J.B., Schwarz,H., and Mayer,A. (2004). Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem*. 279, 9987-9996.

Kurz,A., Egensperger,R., Haupt,M., Lautenschlager,N., Romero,B., Graeber,M.B., and Muller,U. (1996). Apolipoprotein E epsilon 4 allele, cognitive decline, and deterioration of everyday performance in Alzheimer's disease. *Neurology*. 47, 440-443.

Kuusisto,J., Koivisto,K., Kervinen,K., Mykkanen,L., Helkala,E.L., Vanhanen,M., Hanninen,T., Pyorala,K., Kesaniemi,Y.A., Riekkinen,P., and . (1994). Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *BMJ*. 309, 636-638.



LaDu,M.J., Falduto,M.T., Manelli,A.M., Reardon,C.A., Getz,G.S., and Frail,D.E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem*. 269, 23403-23406.

LaFerla,F.M. and Oddo,S. (2005). Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med*. 11, 170-176.

LaFerla,F.M. and Green,K.N. (2012). Animal models of Alzheimer disease . *Cold Spring Harb.Perspect.Med*. 2 , a006320.

Lai,A., Sisodia,S.S., and Trowbridge,I.S. (1995). Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 270, 3565-3573.

Laird,F.M., Cai,H., Savonenko,A.V., Farah,M.H. , He,K., Melnikova,T., Wen,H., Chiang,H.C., Xu,G., Koliatsos,V.E., Borchelt,D.R., Price,D.L., Lee,H.K., and Wong,P.C. (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci*. 25, 11693-11709.

Lambert,J.C., Heath,S., Even,G., Campion,D., Sleegers,K., Hiltunen,M., Combarros,O., Zelenika,D., Bullido,M.J., Tavernier,B., Letenneur,L., Bettens,K., Berr,C., Pasquier,F., Fievet,N., Barberger-Gateau,P., Engelborghs,S., De Deyn,P., Mateo,I., Franck,A., Helisalmi,S., Porcellini,E., Hanon,O., de Pancorbo,M.M., Lendon,C., Dufouil,C., Jaillard,C., Leveillard,T., Alvarez,V., Bosco,P., Mancuso,M., Panza,F., Nacmias,B., Bossu,P., Piccardi,P., Annoni,G., Seripa,D., Galimberti,D., Hannequin,D., Licastro,F., Soininen,H., Ritchie,K., Blanche,H., Dartigues,J.F., Tzourio,C., Gut,I., Van Broeckhoven,C., Alperovitch,A., Lathrop,M., and Amouyel,P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* **41**, 1094-1099.

Lambert,J.C., Ibrahim-Verbaas,C.A., Harold,D., Naj,A.C., Sims,R., Bellenguez,C., DeStafano,A.L., Bis,J.C., Beecham,G.W., Grenier-Boley,B., Russo,G., Thorton-Wells,T.A., Jones,N., Smith,A.V., Chouraki,V., Thomas,C., Ikram,M.A., Zelenika,D., Vardarajan,B.N., Kamatani,Y., Lin,C.F., Gerrish,A., Schmidt,H., Kunkle,B., Dunstan,M.L., Ruiz,A., Bihoreau,M.T., Choi,S.H., Reitz,C., Pasquier,F., Cruchaga,C., Craig,D., Amin,N., Berr,C., Lopez,O.L., De Jager,P.L., Deramecourt,V., Johnston,J.A., Evans,D., Lovestone,S., Letenneur,L., Moron,F.J., Rubinsztein,D.C., Eiriksdottir,G., Sleegers,K., Goate,A.M., Fievet,N., Huentelman,M.W., Gill,M., Brown,K., Kamboh,M.I., Keller,L., Barberger-Gateau,P., McGuinness,B., Larson,E.B., Green,R., Myers,A.J., Dufouil,C., Todd,S., Wallon,D., Love,S., Rogaeva,E., Gallacher,J., George-Hyslop,P., Clarimon,J., Lleo,A., Bayer,A., Tsuang,D.W., Yu,L., Tsolaki,M., Bossu,P., Spalletta,G., Proitsi,P., Collinge,J., Sorbi,S., Sanchez-Garcia,F., Fox,N.C., Hardy,J., Deniz Naranjo,M.C., Bosco,P., Clarke,R., Brayne,C., Galimberti,D., Mancuso,M., Matthews,F., Moebus,S., Mecocci,P., Del Zompo,M., Maier,W., Hampel,H., Pilotto,A., Bullido,M., Panza,F., Caffarra,P., Nacmias,B., Gilbert,J.R., Mayhaus,M., Lannefelt,L., Hakonarson,H., Pichler,S., Carrasquillo,M.M., Ingelsson,M., Beekly,D., Alvarez,V., Zou,F., Valladares,O., Younkin,S.G., Coto,E., Hamilton-Nelson,K.L., Gu,W., Razquin,C., Pastor,P., Mateo,I., Owen,M.J., Faber,K.M., Jonsson,P.V., Combarros,O., O'Donovan,M.C., Cantwell,L.B., Soininen,H., Blacker,D., Mead,S., Mosley,T.H., Jr., Bennett,D.A., Harris,T.B., Fratiglioni,L., Holmes,C., de Bruijn,R.F., Passmore,P., Montine,T.J., Bettens,K., Rotter,J.I., Brice,A., Morgan,K., Foroud,T.M., Kukull,W.A., Hannequin,D., Powell,J.F., Nalls,M.A., Ritchie,K., Lunetta,K.L., Kauwe,J.S., Boerwinkle,E., Riemenschneider,M., Boada,M., Hiltunen,M., Martin,E.R., Schmidt,R., Rujescu,D., Wang,L.S., Dartigues,J.F., Mayeux,R., Tzourio,C., Hofman,A., Nothen,M.M., Graff,C., Psaty,B.M., Jones,L., Haines,J.L., Holmans,P.A., Lathrop,M., Pericak-Vance,M.A., Launer,L.J., Farrer,L.A., van Duijn,C.M., Van Broeckhoven,C., Moskvina,V., Seshadri,S., Williams,J., Schellenberg,G.D., and Amouyel,P. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* **45**, 1452-1458.

Lambert,J.C., Mann,D., Richard,F., Tian,J., Shi,J., Thaker,U., Merrot,S., Harris,J., Frigard,B., Iwatsubo,T., Lendon,C., and Amouyel,P. (2005). Is there a relation between APOE expression and brain amyloid load in Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **76**, 928-933.

Lammich,S., Kojro,E., Postina,R., Gilbert,S., Pfeiffer,R., Jasionowski,M., Haass,C., and Fahrenholz,F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* **96**, 3922-3927.

Lammie GA. Hypertensive cerebral small vessel disease and stroke. *Brain Pathol.* 2002 Jul;12(3):358-70.

Laudon, H., Hansson, E.M., Melen, K., Bergman, A., Farmery, M.R., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., and Naslund, J. (2005). A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem.* 280, 35352-35360.

Laurent, C., Eddarkaoui, S., Derisbourg, M., Leboucher, A., Demeyer, D., Carrier, S., Schneider, M., Hamdane, M., Muller, C.E., Buee, L., and Blum, D. (2014). Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiol Aging.* 35, 2079-2090.

Lavan, B.E., Fantin, V.R., Chang, E.T., Lane, W.S., Keller, S.R., and Lienhard, G.E. (1997). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem.* 272, 21403-21407.

LaVoie, M.J., Fraering, P.C., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Kimberly, W.T., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem.* 278, 37213-37222.

Lebenberg, J., Herard, A.S., Dubois, A., Dhenain, M., Hantraye, P., and Delzescaux, T. (2010). Automated indexation of metabolic changes in Alzheimer's mice using a voxel-wise approach combined to an MRI-based 3D digital atlas. *Conf. Proc. IEEE Eng Med Biol Soc.* 2010:5636-9. doi: 10.1109/IEMBS.2010.5628043., 5636-5639.

Lee, H. and Cameron, M. (2004). Respite care for people with dementia and their carers. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004396.

Lee, I.H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., and Finkel, T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 105, 3374-3379.

Lehman, N.L. (2009). The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathol.* 118, 329-347.

Leighton, P.A., Mitchell, K.J., Goodrich, L.V., Lu, X., Pinson, K., Scherz, P., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M. (2001). Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature.* 410, 174-179.

Lester-Coll, N., Rivera, E.J., Soscia, S.J., Doiron, K., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2006). Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 9, 13-33.

Letenneur, L., Commenges, D., Dartigues, J.F., and Barberger-Gateau, P. (1994). Incidence of dementia and Alzheimer's disease in elderly community residents of south-western France. *Int J Epidemiol.* 23, 1256-1261.

Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., and McGowan, E. (2001). Enhanced

neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 293, 1487-1491.

Lieb,W., Beiser,A.S., Vasan,R.S., Tan,Z.S., Au,R., Harris,T.B., Roubenoff,R., Auerbach,S., Decarli,C., Wolf,P.A., and Seshadri,S. (2009). Association of plasma leptin levels with incident Alzheimer disease and MRI measures of brain aging. *JAMA*. 302, 2565-2572.

Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Nov;35(11):1505-35.

Lobo,A., Launer,L.J., Fratiglioni,L., Andersen,K., Di Carlo,A., Breteler,M.M., Copeland,J.R., Dartigues,J.F., Jagger,C., Martinez-Lage,J., Soininen,H., and Hofman,A. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 54, S4-S9.

Loeb,J.A. (2003). Neuregulin: an activity-dependent synaptic modulator at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*. 32, 649-664.

Lopez-Perez,E., Zhang,Y., Frank,S.J., Creemers,J., Seidah,N., and Checler,F. (2001). Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem*. 76, 1532-1539.

Lorenzen,A., Samosh,J., Vandewark,K., Anborgh,P.H., Seah,C., Magalhaes,A.C., Cregan,S.P., Ferguson,S.S., and Pasternak,S.H. (2010). Rapid and direct transport of cell surface APP to the lysosome defines a novel selective pathway. *Mol Brain*. 3:11. doi: 10.1186/1756-6606-3-11., 11-13.

Luchsinger,J.A., Tang,M.X., Stern,Y., Shea,S., and Mayeux,R. (2001). Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort. *Am J Epidemiol*. 154, 635-641.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004 Oct 12;63(7):1187-92.

Luchsinger,J.A. (2008). Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur J Pharmacol*. 585, 119-129.

Luchsinger JA, Gustafson DR. Adiposity, type 2 diabetes, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2009;16(4):693-704. doi: 10.3233/JAD-2009-1022.

Lue,L.F., Kuo,Y.M., Roher,A.E., Brachova,L., Shen,Y., Sue,L., Beach,T., Kurth,J.H., Rydel,R.E., and Rogers,J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 155, 853-862.

Lund,E.T., McKenna,R., Evans,D.B., Sharma,S.K., and Mathews,W.R. (2001). Characterization of the in vitro phosphorylation of human tau by tau protein kinase II (cdk5/p20) using mass spectrometry. *J Neurochem*. 76, 1221-1232.

Luo,W.J., Wang,H., Li,H., Kim,B.S., Shah,S., Lee,H.J., Thinakaran,G., Kim,T.W., Yu,G., and Xu,H. (2003). PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem.* 278, 7850-7854.

- M -

Maas,T., Eidenmuller,J., and Brandt,R. (2000). Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem.* 275, 15733-15740.

Mackay,E.A., Ehrhard,A., Moniatte,M., Guenet,C., Tardif,C., Tarnus,C., Sorokine,O., Heintzelmann,B., Nay,C., Remy,J.M., Higaki,J., van Dorsselaer,A., Wagner,J., Danzin,C., and Mamont,P. (1997). A possible role for cathepsins D, E, and B in the processing of beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Eur J Biochem.* 244, 414-425.

Mahley,R.W., Weisgraber,K.H., and Huang,Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 103, 5644-5651.

Mahley,R.W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 240, 622-630.

Malik,M., Fenko,M.D., Sheikh,A.M., Wen,G., and Li,X. (2011). A novel approach for characterization of cathepsin D protease and its effect on tau and beta-amyloid proteins. *Neurochem Res.* 36, 754-760.

Maloney,J.A., Bainbridge,T., Gustafson,A., Zhang,S., Kyauk,R., Steiner,P., van der,B.M., Liu,Y., Ernst,J.A., Watts,R.J., and Atwal,J.K. (2014). Molecular Mechanisms of Alzheimer's Disease Protection by the A673T Allele of Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem.* jbc.

Manczak,M., Calkins,M.J., and Reddy,P.H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet.* 20, 2495-2509.

Mann,D.M., Marcyniuk,B., Yates,P.O., Neary,D., and Snowden,J.S. (1988). The progression of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and at autopsy. *Neuropathol Appl.Neurobiol.* 14, 177-195.

Mann,D.M. and Jones,D. (1990). Deposition of amyloid (A4) protein within the brains of persons with dementing disorders other than Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neurosci Lett.* 109, 68-75.

Marcello,E., Gardoni,F., Mauceri,D., Romorini,S. , Jeromin,A., Epis,R., Borroni,B., Cattabeni,F., Sala,C., Padovani,A., and Di Luca,M. (2007). Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci.* 27, 1682-1691.

- Marcinkiewicz,M. and Seidah,N.G. (2000). Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem.* 75, 2133-2143.
- Martyn,C.N., Coggon,D.N., Inskip,H., Lacey,R.F., and Young,W.F. (1997). Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Epidemiology.* 8, 281-286.
- Massey,A.C., Kaushik,S., Sovak,G., Kiffin,R., and Cuervo,A.M. (2006). Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 103, 5805-5810.
- Mattson,M.P. (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 6, 337-350.
- Mattson,M.P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77, 1081-1132.
- Mayeux,R. (2003). Apolipoprotein E, Alzheimer disease, and African Americans. *Arch Neurol.* 60, 161-163.
- McDermott,J.R. and Gibson,A.M. (1997). Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases: involvement of insulin-degrading enzyme. *Neurochem Res.* 22, 49-56.
- McGeer,P.L., Rogers,J., and McGeer,E.G. (2006). Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis.* 9, 271-276.
- Merlo,S., Spampinato,S., Canonico,P.L., Copani,A., and Sortino,M.A. (2010). Alzheimer's disease: brain expression of a metabolic disorder? *Trends Endocrinol.Metab.* 21, 537-544.
- Michel,G., Mercken,M., Murayama,M., Noguchi,K., Ishiguro,K., Imahori,K., and Takashima,A. (1998). Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 1380, 177-182.
- Milla,M.E., Gonzales,P.E., and Leonard,J.D. (2006). The TACE zymogen: re-examining the role of the cysteine switch. *Cell Biochem Biophys.* 44, 342-348.
- Milner,R., Wilby,M., Nishimura,S., Boylen,K., Edwards,G., Fawcett,J., Streuli,C., Pytela,R., and ffrench-Constant,C. (1997). Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev.Biol.* 185, 215-228.
- Minichiello,L., Korte,M., Wolfer,D., Kuhn,R., Unsicker,K., Cestari,V., Rossi-Arnaud,C., Lipp,H.P., Bonhoeffer,T., and Klein,R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron.* 24, 401-414.
- Miyata,M. and Smith,J.D. (1996). Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet.* 14, 55-61.
- Moloney,A.M., Griffin,R.J., Timmons,S., O'Connor,R., Ravid,R., and O'Neill,C. (2010). Defects in IGF-1 receptor, insulin receptor and IRS-1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF-1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging.* 31, 224-243.

Mondragon-Rodriguez,S., Trillaud-Doppia,E., Dudilot,A., Bourgeois,C., Lauzon,M., Leclerc,N., and Boehm,J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem.* 287, 32040-32053.

Morimoto,T., Ohsawa,I., Takamura,C., Ishiguro,M. , and Kohsaka,S. (1998). Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 51, 185-195.

Morley,J.E. and Farr,S.A. (2014). The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochem Pharmacol.* 88, 479-485.

Mucke,L., Masliah,E., Yu,G.Q., Mallory,M., Rockenstein,E.M., Tatsuno,G., Hu,K., Kholodenko,D., Johnson-Wood,K., and McConlogue,L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.* 20, 4050-4058.

Mullan,M., Houlden,H., Windelspecht,M., Fidani,L., Lombardi,C., Diaz,P., Rossor,M., Crook,R., Hardy,J., Duff,K., and . (1992). A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet.* 2, 340-342.

Mzhavia,N., Berman,Y.L., Qian,Y., Yan,L., and Devi,L.A. (1999). Cloning, expression, and characterization of human metalloprotease 1: a novel member of the pitrilysin family of metalloendoproteases. *DNA Cell Biol.* 18, 369-380.

- N -

Nagano,S., Huang,X., Moir,R.D., Payton,S.M., Tanzi,R.E., and Bush,A.I. (2004). Peroxidase activity of cyclooxygenase-2 (COX-2) cross-links beta-amyloid (Abeta) and generates Abeta-COX-2 hetero-oligomers that are increased in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 279, 14673-14678.

Nagy,Z., Jobst,K.A., Esiri,M.M., Morris,J.H., King,E.M., MacDonald,B., Litchfield,S., Barnetson,L., and Smith,A.D. (1996). Hippocampal pathology reflects memory deficit and brain imaging measurements in Alzheimer's disease: clinicopathologic correlations using three sets of pathologic diagnostic criteria. *Dementia.* 7, 76-81.

Naj,A.C., Jun,G., Beecham,G.W., Wang,L.S., Vardarajan,B.N., Buross,J., Gallins,P.J., Buxbaum,J.D., Jarvik,G.P., Crane,P.K., Larson,E.B., Bird,T.D., Boeve,B.F., Graff-Radford,N.R., De Jager,P.L., Evans,D., Schneider,J.A., Carrasquillo,M.M., Ertekin-Taner,N., Younkin,S.G., Cruchaga,C., Kauwe,J.S., Nowotny,P., Kramer,P., Hardy,J., Huentelman,M.J., Myers,A.J., Barmada,M.M., Demirci,F.Y., Baldwin,C.T., Green,R.C., Rogaeva,E., George-Hyslop,P., Arnold,S.E., Barber,R., Beach,T., Bigio,E.H., Bowen,J.D., Boxer,A., Burke,J.R., Cairns,N.J., Carlson,C.S., Carney,R.M., Carroll,S.L., Chui,H.C., Clark,D.G., Corneveaux,J., Cotman,C.W., Cummings,J.L., Decarli,C., DeKosky,S.T., Diaz-Arrastia,R., Dick,M., Dickson,D.W., Ellis,W.G., Faber,K.M., Fallon,K.B., Farlow,M.R., Ferris,S., Frosch,M.P., Galasko,D.R., Ganguli,M., Gearing,M., Geschwind,D.H., Ghetti,B., Gilbert,J.R., Gilman,S.,

Giordani,B., Glass,J.D., Growdon,J.H., Hamilton,R.L., Harrell,L.E., Head,E., Honig,L.S., Hulette,C.M., Hyman,B.T., Jicha,G.A., Jin,L.W., Johnson,N., Karlawish,J., Karydas,A., Kaye,J.A., Kim,R., Koo,E.H., Kowall,N.W., Lah,J.J., Levey,A.I., Lieberman,A.P., Lopez,O.L., Mack,W.J., Marson,D.C., Martiniuk,F., Mash,D.C., Masliah,E., McCormick,W.C., McCurry,S.M., McDavid,A.N., McKee,A.C., Mesulam,M., Miller,B.L., Miller,C.A., Miller,J.W., Parisi,J.E., Perl,D.P., Peskind,E., Petersen,R.C., Poon,W.W., Quinn,J.F., Rajbhandary,R.A., Raskind,M., Reisberg,B., Ringman,J.M., Roberson,E.D., Rosenberg,R.N., Sano,M., Schneider,L.S., Seeley,W., Shelanski,M.L., Slifer,M.A., Smith,C.D., Sonnen,J.A., Spina,S., Stern,R.A., Tanzi,R.E., Trojanowski,J.Q., Troncoso,J.C., Van Deerlin,V.M., Vinters,H.V., Vonsattel,J.P., Weintraub,S., Welsh-Bohmer,K.A., Williamson,J., Woltjer,R.L., Cantwell,L.B., Dombroski,B.A. , Beekly,D., Lunetta,K.L., Martin,E.R., Kamboh,M.I., Saykin,A.J., Reiman,E.M., Bennett,D.A., Morris,J.C., Montine,T.J., Goate,A.M., Blacker,D., Tsuang,D.W., Hakonarson,H., Kukull,W.A., Foroud,T.M., Haines,J.L., Mayeux,R., Pericak-Vance,M.A. , Farrer,L.A., and Schellenberg,G.D. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 43, 436-441.

Nakamura,Y., Takeda,M., Suzuki,H., Morita,H., Tada,K., Hariguchi,S., and Nishimura,T. (1989). Age-dependent change in activities of lysosomal enzymes in rat brain. *Mech.Ageing Dev.* 50, 215-225.

Nakanishi,H., Tominaga,K., Amano,T., Hirotsu,I., Inoue,T., and Yamamoto,K. (1994). Age-related changes in activities and localizations of cathepsins D, E, B, and L in the rat brain tissues. *Exp Neurol.* 126, 119-128.

Nakanishi,H., Amano,T., Sastradipura,D.F., Yoshimine,Y., Tsukuba,T., Tanabe,K., Hirotsu,I., Ohono,T., and Yamamoto,K. (1997). Increased expression of cathepsins E and D in neurons of the aged rat brain and their colocalization with lipofuscin and carboxy-terminal fragments of Alzheimer amyloid precursor protein. *J Neurochem.* 68, 739-749.

Namba,Y., Tomonaga,M., Kawasaki,H., Otomo,E., and Ikeda,K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541, 163-166.

Naus,S., Richter,M., Wildeboer,D., Moss,M., Schachner,M., and Bartsch,J.W. (2004). Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J Biol Chem.* 279, 16083-16090.

Naus,S., Reipschlager,S., Wildeboer,D., Lichtenthaler,S.F., Mitterreiter,S., Guan,Z. , Moss,M.L., and Bartsch,J.W. (2006). Identification of candidate substrates for ectodomain shedding by the metalloprotease-disintegrin ADAM8. *Biol Chem.* 387, 337-346.

Ngandu T, von Strauss E, Helkala EL, Winblad B, Nissinen A, Tuomilehto J, Soininen H, Kivipelto M. Education and dementia: what lies behind the association? *Neurology.* 2007 Oct 2;69(14):1442-50.

Nielsen,M.S., Gustafsen,C., Madsen,P., Nyengaard,J.R., Hermey,G., Bakke,O., Mari,M., Schu,P., Pohlmann,R., Dennes,A., and Petersen,C.M. (2007). Sorting by the cytoplasmic

domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol Cell Biol.* 27, 6842-6851.

Niimura,M., Isoo,N., Takasugi,N., Tsuruoka,M., Ui-Tei,K., Saigo,K., Morohashi,Y., Tomita,T., and Iwatsubo,T. (2005). Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem.* 280, 12967-12975.

Nixon,R.A., Cataldo,A.M., and Mathews,P.M. (2000). The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res.* 25, 1161-1172.

Nizzari,M., Venezia,V., Repetto,E., Caorsi,V., Magrassi,R., Gagliani,M.C., Carlo,P., Florio,T., Schettini,G., Tacchetti,C., Russo,T., Diaspro,A., and Russo,C. (2007). Amyloid precursor protein and Presenilin1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK 1,2 signaling. *J Biol Chem.* 282, 13833-13844.

Noble,W., Olm,V., Takata,K., Casey,E., Mary,O., Meyerson,J., Gaynor,K., LaFrancois,J., Wang,L., Kondo,T., Davies,P., Burns,M., Veeranna, Nixon,R. , Dickson,D., Matsuoka,Y., Ahljanian,M., Lau,L.F., and Duff,K. (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron.* 38, 555-565.

Nunan,J. and Small,D.H. (2002). Proteolytic processing of the amyloid-beta protein precursor of Alzheimer's disease. *Essays Biochem.* 38:37-49., 37-49.



Oddo,S., Caccamo,A., Shepherd,J.D., Murphy,M.P. , Golde,T.E., Kaye,R., Metherate,R., Mattson,M.P., Akbari,Y., and LaFerla,F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 39, 409-421.

Offe,K., Dodson,S.E., Shoemaker,J.T., Fritz,J.J. , Gearing,M., Levey,A.I., and Lah,J.J. (2006). The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci.* 26, 1596-1603.

Ohnishi,S. and Takano,K. (2004). Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol Life Sci.* 61, 511-524.

Orgogozo,J.M., Dartigues,J.F., Lafont,S., Letenneur,L., Commenges,D., Salamon,R., Renaud,S., and Breteler,M.B. (1997). Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev Neurol (Paris).* 153, 185-192.

Orth,P., Reichert,P., Wang,W., Prosise,W.W., Yarosh-Tomaine,T., Hammond,G., Ingram,R.N., Xiao,L., Mirza,U.A., Zou,J., Strickland,C., Taremi,S.S., Le,H.V., and Madison,V. (2004). Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. *J Mol Biol.* 335, 129-137.

Owen,J.B., Sultana,R., Aluise,C.D., Erickson,M.A., Price,T.O., Bu,G., Banks,W.A., and Butterfield,D.A. (2010). Oxidative modification to LDL receptor-related protein 1 in hippocampus from subjects with Alzheimer disease: implications for Abeta accumulation in AD brain. *Free Radic.Biol Med.* 49, 1798-1803.

- P -

Palmer,A.M. (2002). Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects. *Trends Pharmacol.Sci.* 23, 426-433.

Pant,S., Sharma,M., Patel,K., Caplan,S., Carr,C.M., and Grant,B.D. (2009). AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol.* 11, 1399-1410.

Pardossi-Piquard,R. and Checler,F. (2012). The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem.* 120 Suppl 1:109-24. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x. *Epub*; %2011 Nov 28., 109-124.

Park,C.R. (2001). Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav.Rev.* 25, 311-323.

Park,H., Kam,T.I., Kim,Y., Choi,H., Gwon,Y., Kim,C., Koh,J.Y., and Jung,Y.K. (2012). Neuropathogenic role of adenylate kinase-1 in Abeta-mediated tau phosphorylation via AMPK and GSK3beta. *Hum Mol Genet.* 21, 2725-2737.

Pathak D, Berthet A, Nakamura K. Energy failure: does it contribute to neurodegeneration? *Ann Neurol.* 2013 Oct;74(4):506-16. doi: 10.1002/ana.24014.

Pavlov,P.F., Wiehager,B., Sakai,J., Frykman,S., Behbahani,H., Winblad,B., and Ankarcrona,M. (2011). Mitochondrial gamma-secretase participates in the metabolism of mitochondria-associated amyloid precursor protein. *FASEB J.* 25, 78-88.

Peiretti,F., Deprez-Beauclair,P., Bonardo,B., Aubert,H., Juhan-Vague,I., and Nalbone,G. (2003). Identification of SAP97 as an intracellular binding partner of TACE. *J Cell Sci.* 116, 1949-1957.

Perlmutter,L.S., Barron,E., Saperia,D., and Chui,H.C. (1991). Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 30, 673-681.

Pfriege,F.W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 60, 1158-1171.

Piedrahita,D., Hernandez,I., Lopez-Tobon,A., Fedorov,D., Obara,B., Manjunath,B.S., Boudreau,R.L., Davidson,B., Laferla,F., Gallego-Gomez,J.C., Kosik,K.S., and Cardona-Gomez,G.P. (2010). Silencing of CDK5 reduces neurofibrillary tangles in transgenic alzheimer's mice. *J Neurosci.* %20;30, 13966-13976.

Pinho,C.M., Teixeira,P.F., and Glaser,E. (2014). Mitochondrial import and degradation of amyloid-beta peptide. *Biochim.Biophys.Acta.* 1837, 1069-1074.

Plum L, Schubert M, Brüning JC.The role of insulin receptor signaling in the brain.*Trends Endocrinol Metab.* 2005 Mar;16(2):59-65.

Primakoff,P. and Myles,D.G. (2000). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 16, 83-87.

Puente,X.S. and Lopez-Otin,C. (2004). A genomic analysis of rat proteases and protease inhibitors. *Genome Res.* 14, 609-622.

- Q - R -

Querfurth,H.W. and LaFerla,F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N Engl.J Med.* 362, 329-344.

Qiu C, Kivipelto M, Fratiglioni L. Preventing Alzheimer disease and cognitive decline. *Ann Intern Med.* 2011 Feb 1;154(3):211; author reply 212-3. doi:10.7326/0003-4819-154-3-201102010-00014.

Raber,J., Wong,D., Buttini,M., Orth,M., Bellosta,S., Pitas,R.E., Mahley,R.W., and Mucke,L. (1998). Isoform-specific effects of human apolipoprotein E on brain function revealed in ApoE knockout mice: increased susceptibility of females. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 95, 10914-10919.

Rajendran,R., Rajeesh,M.P., Shaikh,S., Shanthi, and Pillai,M.R. (2006). Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-2 and MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in oral submucous fibrosis. *Indian J Dent.Res.* 17, 161-166.

Ramaroson,H., Helmer,C., Barberger-Gateau,P., Letenneur,L., and Dartigues,J.F. (2003). [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev Neurol (Paris).* 159, 405-411.

Raucci,A., Cugusi,S., Antonelli,A., Barabino,S.M., Monti,L., Bierhaus,A., Reiss,K., Saftig,P., and Bianchi,M.E. (2008). A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J.* 22, 3716-3727.

Rawlings,N.D., Waller,M., Barrett,A.J., and Bateman,A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 42, D503-D509.

Rebeck,G.W., Moir,R.D., Mui,S., Strickland,D.K., Tanzi,R.E., and Hyman,B.T. (2001). Association of membrane-bound amyloid precursor protein APP with the apolipoprotein E receptor LRP. *Brain Res Mol Brain Res.* 87, 238-245.

Reddy,M.M., Wilson,R., Wilson,J., Connell,S., Gocke,A., Hynan,L., German,D., and Kodadek,T. (2011). Identification of candidate IgG biomarkers for Alzheimer's disease via combinatorial library screening. *Cell.* 144, 132-142.

Reiman,E.M., Chen,K., Langbaum,J.B., Lee,W., Reschke,C., Bandy,D., Alexander,G.E., and Caselli,R.J. (2010). Higher serum total cholesterol levels in late middle age are associated with glucose hypometabolism in brain regions affected by Alzheimer's disease and normal aging. *Neuroimage*. 49, 169-176.

Reitz,C., Cheng,R., Rogaeva,E., Lee,J.H., Tokuhiro,S., Zou,F., Bettens,K., Sleegers,K., Tan,E.K., Kimura,R., Shibata,N., Arai,H., Kamboh,M.I., Prince,J.A., Maier,W., Riemenschneider,M., Owen,M., Harold,D., Hollingworth,P., Cellini,E., Sorbi,S., Nacmias,B., Takeda,M., Pericak-Vance,M.A., Haines,J.L., Younkin,S., Williams,J., Van Broeckhoven,C., Farrer,L.A., George-Hyslop,P.H., and Mayeux,R. (2011). Meta-analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 68, 99-106.

Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis*. 2005 Dec;8(3):247-68.

Rocha M, Hernandez-Mijares A, Garcia-Malpartida K, Bañuls C, Bellod L, Victor VM. Mitochondria-targeted antioxidant peptides. *Curr Pharm Des*. 2010;16(28):3124-31.

Rogaeva,E., Meng,Y., Lee,J.H., Gu,Y., Kawarai,T., Zou,F., Katayama,T., Baldwin,C.T., Cheng,R., Hasegawa,H., Chen,F., Shibata,N., Lunetta,K.L., Pardossi-Piquard,R., Bohm,C., Wakutani,Y., Cupples,L.A., Cuenco,K.T., Green,R.C., Pinessi,L., Rainero,I., Sorbi,S., Bruni,A., Duara,R., Friedland,R.P., Inzelberg,R., Hampe,W., Bujo,H., Song,Y.Q., Andersen,O.M., Willnow,T.E., Graff-Radford,N., Petersen,R.C., Dickson,D., Der,S.D., Fraser,P.E., Schmitt-Ulms,G., Younkin,S., Mayeux,R., Farrer,L.A., and George-Hyslop,P. (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*. 39, 168-177.

Roghani,M., Becherer,J.D., Moss,M.L., Atherton,R.E., Erdjument-Bromage,H., Arribas,J., Blackburn,R.K., Weskamp,G., Tempst,P., and Blobel,C.P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem*. 274, 3531-3540.

Roses,A.D. (2006). On the discovery of the genetic association of Apolipoprotein E genotypes and common late-onset Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis*. 9, 361-366.

Rushworth,J.V. and Hooper,N.M. (2010). Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-beta Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *Int J Alzheimers Dis*. 2011:603052. doi: 10.4061/2011/603052., 603052.

Russo,C., Dolcini,V., Salis,S., Venezia,V., Violani,E., Carlo,P., Zambrano,N., Russo,T., and Schettini,G. (2002). Signal transduction through tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal fragments of APP via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *Ann N Y Acad Sci*. 973:323-33., 323-333.

Sadik,G., Kaji,H., Takeda,K., Yamagata,F., Kameoka,Y., Hashimoto,K., Miyanaga,K., and Shinoda,T. (1999). In vitro processing of amyloid precursor protein by cathepsin D. *Int J Biochem Cell Biol.* 31, 1327-1337.

Saftig,P., Peters,C., von Figura,K., Craessaerts,K., Van Leuven,F., and De Strooper,B. (1996). Amyloidogenic processing of human amyloid precursor protein in hippocampal neurons devoid of cathepsin D. *J Biol Chem.* 271, 27241-27244.

Sagane,K., Hayakawa,K., Kai,J., Hirohashi,T., Takahashi,E., Miyamoto,N., Ino,M., Oki,T., Yamazaki,K., and Nagasu,T. (2005). Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neurosci.* 6:33., 33.

Sahin,U., Weskamp,G., Kelly,K., Zhou,H.M., Higashiyama,S., Peschon,J., Hartmann,D., Saftig,P., and Blobel,C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol.* 164, 769-779.

Salama-Cohen,P., Arevalo,M.A., Meier,J., Grantyn,R., and Rodriguez-Tebar,A. (2005). NGF controls dendrite development in hippocampal neurons by binding to p75NTR and modulating the cellular targets of Notch. *Mol Biol Cell.* 16, 339-347.

Sambamurti,K., Greig,N.H., and Lahiri,D.K. (2002). Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular.Med.* 1, 1-31.

Sato S, Tatebayashi Y, Akagi T, Chui DH, Murayama M, Miyasaka T, Planel E, Tanemura K, Sun X, Hashikawa T, Yoshioka K, Ishiguro K, Takashima A. Aberrant tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β and JNK3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):42060-5.

Sato,T., Dohmae,N., Qi,Y., Kakuda,N., Misonou,H., Mitsumori,R., Maruyama,H., Koo,E.H., Haass,C., Takio,K., Morishima-Kawashima,M., Ishiura,S., and Ihara,Y. (2003). Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 278, 24294-24301.

Sato,T., Tanimura,Y., Hirotani,N., Saido,T.C., Morishima-Kawashima,M., and Ihara,Y. (2005). Blocking the cleavage at midportion between gamma- and epsilon-sites remarkably suppresses the generation of amyloid beta-protein. *FEBS Lett.* 579, 2907-2912.

Sato C, Morohashi Y, Tomita T, Iwatsubo T. Structure of the catalytic pore of gamma-secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci.* 2006 Nov 15;26(46):12081-8.

Savonenko,A.V., Melnikova,T., Laird,F.M., Stewart,K.A., Price,D.L., and Wong,P.C. (2008). Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 105, 5585-5590.

Scherzer,C.R., Offe,K., Gearing,M., Rees,H.D., Fang,G., Heilman,C.J., Schaller,C., Bujo,H., Levey,A.I., and Lah,J.J. (2004). Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 61, 1200-1205.

Schlomann,U., Wildeboer,D., Webster,A., Antropova,O., Zeuschner,D., Knight,C.G., Docherty,A.J., Lambert,M., Skelton,L., Jockusch,H., and Bartsch,J.W. (2002). The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J Biol Chem.* 277, 48210-48219.

Schmand,B., Huizenga,H.M., and van Gool,W.A. (2010). Meta-analysis of CSF and MRI biomarkers for detecting preclinical Alzheimer's disease. *Psychol Med.* 40, 135-145.

Schmidt,V., Baum,K., Lao,A., Rateitschak,K., Schmitz,Y., Teichmann,A., Wiesner,B., Petersen,C.M., Nykjaer,A., Wolf,J., Wolkenhauer,O. , and Willnow,T.E. (2012). Quantitative modelling of amyloidogenic processing and its influence by SORLA in Alzheimer's disease. *EMBO J.* 31, 187-200.

Schweber,M. (1985). A possible unitary genetic hypothesis for Alzheimer's disease and Down syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 450:223-38., 223-238.

Seals,D.F. and Courtneidge,S.A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17, 7-30.

Selkoe,D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 81, 741-766.

Selkoe,D.J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* 8, 447-453.

Selkoe,D.J. (1997). Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science.* 275, 630-631.

Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buée L. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics.* 2008 Apr;5(2):207-24. doi:10.1586/14789450.5.2.207.

Seshadri,S., Fitzpatrick,A.L., Ikram,M.A., DeStefano,A.L., Gudnason,V., Boada,M., Bis,J.C., Smith,A.V., Carassquillo,M.M., Lambert,J.C., Harold,D., Schrijvers,E.M., Ramirez-Lorca,R., DeBette,S., Longstreth,W.T., Jr., Janssens,A.C., Pankratz,V.S., Dartigues,J.F., Hollingworth,P., Aspelund,T., Hernandez,I., Beiser,A., Kuller,L.H., Koudstaal,P.J., Dickson,D.W., Tzourio,C., Abraham,R., Antunez,C. , Du,Y., Rotter,J.I., Aulchenko,Y.S., Harris,T.B., Petersen,R.C., Berr,C., Owen,M.J., Lopez-Arrieta,J., Varadarajan,B.N., Becker,J.T., Rivadeneira,F., Nalls,M.A., Graff-Radford,N.R., Campion,D., Auerbach,S., Rice,K., Hofman,A., Jonsson,P.V., Schmidt,H., Lathrop,M., Mosley,T.H., Au,R., Psaty,B.M., Uitterlinden,A.G., Farrer,L.A., Lumley,T., Ruiz,A., Williams,J., Amouyel,P., Younkin,S.G., Wolf,P.A., Launer,L.J., Lopez,O.L., van Duijn,C.M. , and Breteler,M.M. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA.* 303, 1832-1840.

Shah,S., Lee,S.F., Tabuchi,K., Hao,Y.H., Yu,C., LaPlant,Q., Ball,H., Dann,C.E., III, Sudhof,T., and Yu,G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*. 122, 435-447.

Sharples,R.A., Vella,L.J., Nisbet,R.M., Naylor,R., Perez,K., Barnham,K.J., Masters,C.L., and Hill,A.F. (2008). Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *FASEB J*. 22, 1469-1478.

Sherrington,R., Rogaev,E.I., Liang,Y., Rogaeva,E.A., Levesque,G., Ikeda,M., Chi,H., Lin,C., Li,G., Holman,K., Tsuda,T., Mar,L., Foncin,J.F., Bruni,A.C., Montesi,M.P., Sorbi,S., Rainero,I., Pinessi,L., Nee,L., Chumakov,I., Pollen,D., Brookes,A., Sanseau,P., Polinsky,R.J., Wasco,W., Da Silva,H.A., Haines,J.L., Perkicak-Vance,M.A., Tanzi,R.E., Roses,A.D., Fraser,P.E., Rommens,J.M., and George-Hyslop,P.H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375, 754-760.

Shirotani,K., Edbauer,D., Kostka,M., Steiner,H., and Haass,C. (2004). Immature nicastrin stabilizes A β 1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with A β 1. *J Neurochem*. 89, 1520-1527.

Shirotani,K., Edbauer,D., Prokop,S., Haass,C., and Steiner,H. (2004). Identification of distinct gamma-secretase complexes with different A β 1 variants. *J Biol Chem*. 279, 41340-41345.

Shirotani,K., Edbauer,D., Capell,A., Schmitz,J., Steiner,H., and Haass,C. (2003). Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J Biol Chem*. 278, 16474-16477.

Skovronsky,D.M., Fath,S., Lee,V.M., and Milla,M.E. (2001). Neuronal localization of the TNF α converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques. *J Neurobiol*. 49, 40-46.

Slack,B.E., Ma,L.K., and Seah,C.C. (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor- α converting enzyme. *Biochem J*. 357, 787-794.

Small,G.W., Kepe,V., Ercoli,L.M., Siddarth,P., Bookheimer,S.Y., Miller,K.J., Lavretsky,H., Burggren,A.C., Cole,G.M., Vinters,H.V., Thompson,P.M., Huang,S.C., Satyamurthy,N., Phelps,M.E., and Barrio,J.R. (2006). PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med*. 355, 2652-2663.

Soldan A, Pettigrew C, Li S, Wang MC, Moghekar A, Selnes OA, Albert M, O'Brien R; BIOCARD Research Team. Relationship of cognitive reserve and cerebrospinal fluid biomarkers to the emergence of clinical symptoms in preclinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013 Dec;34(12):2827-34. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.017.

Soond,S.M., Everson,B., Riches,D.W., and Murphy,G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci*. 118, 2371-2380.

Southan C, Hancock JM. A tale of two drug targets: the evolutionary history of BACE1 and BACE2. *Front Genet.* 2013;4:293. doi: 10.3389/fgene.2013.00293.

St George-Hyslop, P.H., Tanzi, R.E., Polinsky, R.J., Haines, J.L., Nee, L., Watkins, P.C., Myers, R.H., Feldman, R.G., Pollen, D., Drachman, D., and . (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science.* 235, 885-890.

Staes, A., Van Damme, P., Helsens, K., Demol, H., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2008). Improved recovery of proteome-informative, protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC). *Proteomics.* 8, 1362-1370.

Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R., and de la Monte, S.M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis.* 7, 63-80.

Stern, Y., Gurland, B., Tatemichi, T.K., Tang, M.X., Wilder, D., and Mayeux, R. (1994). Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA.* 271, 1004-1010.

Stewart R, Xue QL, Masaki K, Petrovitch H, Ross GW, White LR, Launer LJ. Change in blood pressure and incident dementia: a 32-year prospective study. *Hypertension.* 2009 Aug;54(2):233-40. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.128744.

Stratman, N.C., Castle, C.K., Taylor, B.M., Epps, D.E., Melchior, G.W., and Carter, D.B. (2005). Isoform-specific interactions of human apolipoprotein E to an intermediate conformation of human Alzheimer amyloid-beta peptide. *Chem Phys.Lipids.* 137, 52-61.

Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 90, 8098-8102.

Suzuki, T. and Nakaya, T. (2008). Regulation of amyloid beta-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. *J Biol Chem.* 283, 29633-29637.

Suzuki Y, Brender JR, Hartman K, Ramamoorthy A, Marsh EN. Alternative pathways of human islet amyloid polypeptide aggregation distinguished by (19)f nuclear magnetic resonance-detected kinetics of monomer consumption. *Biochemistry.* 2012 Oct 16;51(41):8154-62. doi: 10.1021/bi3012548.

Swendeman, S., Mendelson, K., Weskamp, G., Horiuchi, K., Deutsch, U., Scherle, P., Hooper, A., Rafii, S., and Blobel, C.P. (2008). VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ.Res.* 103, 916-918.

Takami,M., Nagashima,Y., Sano,Y., Ishihara,S., Morishima-Kawashima,M., Funamoto,S., and Ihara,Y. (2009). gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci.* 29, 13042-13052.

Takasugi,N., Tomita,T., Hayashi,I., Tsuruoka,M., Niimura,M., Takahashi,Y., Thinakaran,G., and Iwatsubo,T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature.* 422, 438-441.

Takeda,S., Igarashi,T., Mori,H., and Araki,S. (2006). Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J.* 25, 2388-2396.

Takeda,S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin.Cell Dev.Biol.* 20, 146-152.

Talbot,K., Wang,H.Y., Kazi,H., Han,L.Y., Bakshi,K.P., Stucky,A., Fuino,R.L., Kawaguchi,K.R., Samoyedny,A.J., Wilson,R.S., Arvanitakis,Z., Schneider,J.A., Wolf,B.A., Bennett,D.A., Trojanowski,J.Q., and Arnold,S.E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest.* 122, 1316-1338.

Talbot K, Wang HY. The nature, significance, and glucagon-like peptide-1 analog treatment of brain insulin resistance in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014 Feb;10(1 Suppl):S12-25. doi: 10.1016/j.jalz.2013.12.007.

Tamayev,R., Zhou,D., and D'Adamio,L. (2009). The interactome of the amyloid beta precursor protein family members is shaped by phosphorylation of their intracellular domains. *Mol Neurodegener.* 4:28. doi: 10.1186/1750-1326-4-28., 28-4.

Tanabe,C., Hotoda,N., Sasagawa,N., Sehara-Fujisawa,A., Maruyama,K., and Ishiura,S. (2007). ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochem Biophys.Res Commun.* 352, 111-117.

Tanaka,S., Nakamura,S., Ueda,K., Kameyama,M., Shiojiri,S., Takahashi,Y., Kitaguchi,N., and Ito,H. (1988). Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys.Res Commun.* 157, 472-479.

Tanaka,S., Shiojiri,S., Takahashi,Y., Kitaguchi,N., Ito,H., Kameyama,M., Kimura,J., Nakamura,S., and Ueda,K. (1989). Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys.Res Commun.* 165, 1406-1414.

Tanzi,R.E., Moir,R.D., and Wagner,S.L. (2004). Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron.* 43, 605-608.

Tao,Q.Q., Chen,Y., Liu,Z.J., Sun,Y.M., Yang,P., Lu,S.J., Xu,M., Dong,Q.Y., Yang,J.J., and Wu,Z.Y. (2014). Associations between apolipoprotein E genotypes and serum levels of glucose, cholesterol, and triglycerides in a cognitively normal aging Han Chinese population. *Clin Interv.Aging.* 9:1063-7. doi: 10.2147/CIA.S62554. eCollection,%2014., 1063-1067.

Tate,M.C., Garcia,A.J., Keselowsky,B.G., Schumm,M.A., Archer,D.R., and LaPlaca,M.C. (2004). Specific beta1 integrins mediate adhesion, migration, and differentiation of neural progenitors derived from the embryonic striatum. *Mol Cell Neurosci.* 27, 22-31.

Tebar,F., Bohlander,S.K., and Sorkin,A. (1999). Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell.* 10, 2687-2702.

Teixeira,P.F., Pinho,C.M., Branca,R.M., Lehtio,J., Levine,R.L., and Glaser,E. (2012). In vitro oxidative inactivation of human presequence protease (hPreP). *Free Radic.Biol Med.* 53, 2188-2195.

Tellier,E., Canault,M., Rebsomen,L., Bonardo,B., Juhan-Vague,I., Nalbone,G., and Peiretti,F. (2006). The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res.* 312, 3969-3980.

Thinakaran,G., Borchelt,D.R., Lee,M.K., Slunt,H.H., Spitzer,L., Kim,G., Ratovitsky,T., Davenport,F., Nordstedt,C., Seeger,M., Hardy,J., Levey,A.I., Gandy,S.E., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Price,D.L., and Sisodia,S.S. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron.* 17, 181-190.

Tiraboschi,P., Hansen,L.A., Masliah,E., Alford,M., Thal,L.J., and Corey-Bloom,J. (2004). Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology.* 62, 1977-1983.

Tolia A, Chávez-Gutiérrez L, De Strooper B. Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex. *J Biol Chem.* 2006 Sep 15;281(37):27633-42.

Tolppanen AM, Ngandu T, Kåreholt I, Laatikainen T, Rusanen M, Soininen H, Kivipelto M. Midlife and late-life body mass index and late-life dementia: results from a prospective population-based cohort. *J Alzheimers Dis.* 2014;38(1):201-9. doi: 10.3233/JAD-130698.

Tomiyama,T., Matsuyama,S., Iso,H., Umeda,T., Takuma,H., Ohnishi,K., Ishibashi,K., Teraoka,R., Sakama,N., Yamashita,T., Nishitsuji,K., Ito,K., Shimada,H., Lambert,M.P., Klein,W.L., and Mori,H. (2010). A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci.* 30, 4845-4856.

Tousseyn,T., Jorissen,E., Reiss,K., and Hartmann,D. (2006). (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo.Today.* 78, 24-46.

Tousseyn,T., Thathiah,A., Jorissen,E., Raemaekers,T., Konietzko,U., Reiss,K., Maes,E., Snellinx,A., Serneels,L., Nyabi,O., Annaert,W., Saftig,P., Hartmann,D., and De Strooper,B.

(2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J Biol Chem.* **284**, 11738-11747.

Tsien,J.Z., Chen,D.F., Gerber,D., Tom,C., Mercer,E.H., Anderson,D.J., Mayford,M., Kandel,E.R., and Tonegawa,S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell.* **87**, 1317-1326.

Turk,B., Turk,D., and Turk,V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim.Biophys.Acta.* **1477**, 98-111.

Turner,P.R., O'Connor,K., Tate,W.P., and Abraham,W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog.Neurobiol.* **70**, 1-32.

- U - V -

Uchida,T., Myers,M.G., Jr., and White,M.F. (2000). IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. *Mol Cell Biol.* **20**, 126-138.

Valkenborg,D., Thomas,G., Krols,L., Kas,K., and Burzykowski,T. (2009). A strategy for the prior processing of high-resolution mass spectral data obtained from high-dimensional combined fractional diagonal chromatography. *J Mass Spectrom.* **44**, 516-529.

Van Damme,P., Van Damme,J., Demol,H., Staes,A., Vandekerckhove,J., and Gevaert,K. (2009). A review of COFRADIC techniques targeting protein N-terminal acetylation. *BMC Proc.* **3 Suppl 6:S6**. doi: 10.1186/1753-6561-3-S6-S6., S6-3.

Van Oijen,M., Hofman,A., Soares,H.D., Koudstaal,P.J., and Breteler,M.M. (2006). Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol.* **5**, 655-660.

Vandenberghe,R. (2014). The Relationship between Amyloid Deposition, Neurodegeneration, and Cognitive Decline in Dementia. *Curr Neurol Neurosci Rep.* **14**, 498-0498.

Vargas,T., Ugalde,C., Spuch,C., Antequera,D., Moran,M.J., Martin,M.A., Ferrer,I., Bermejo-Pareja,F., and Carro,E. (2010). Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiol Aging.* **31**, 1569-1581.

Vassar,R., Bennett,B.D., Babu-Khan,S., Kahn,S., Mendiaz,E.A., Denis,P., Teplow,D.B., Ross,S., Amarante,P., Loeloff,R., Luo,Y., Fisher,S., Fuller,J., Edenson,S., Lile,J., Jarosinski,M.A., Biere,A.L., Curran,E., Burgess,T., Louis,J.C., Collins,F., Treanor,J., Rogers,G., and Citron,M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* **286**, 735-741.

Venezia,V., Nizzari,M., Repetto,E., Violani,E., Corsaro,A., Thellung,S., Villa,V., Carlo,P., Schettini,G., Florio,T., and Russo,C. (2006). Amyloid precursor protein modulates ERK-1 and -2 signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1090:455-65., 455-465.

Vetrivel,K.S., Zhang,Y.W., Xu,H., and Thinakaran,G. (2006). Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener.* 1:4., 4.

Vingtdeux,V., Hamdane,M., Loyens,A., Gele,P., Drobeck,H., Begard,S., Galas,M.C., Delacourte,A., Beauvillain,J.C., Buee,L., and Sergeant,N. (2007a). Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem.* 282, 18197-18205.

Vingtdeux,V., Hamdane,M., Begard,S., Loyens,A., Delacourte,A., Beauvillain,J.C., Buee,L., Marambaud,P., and Sergeant,N. (2007b). Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol Dis.* 25, 686-696.

Vingtdeux V, Marambaud P. Identification and biology of α -secretase. *J Neurochem.* 2012 Jan;120 Suppl 1:34-45. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07477.x.

Vogiatzi,T., Xilouri,M., Vekrellis,K., and Stefanis,L. (2008). Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem.* 283, 23542-23556.

- W -

Wahrle,S., Das,P., Nyborg,A.C., McLendon,C., Shoji,M., Kawarabayashi,T., Younkin,L.H., Younkin,S.G., and Golde,T.E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis.* 9, 11-23.

Wakatsuki,S., Kurisaki,T., and Sehara-Fujisawa,A. (2004). Lipid rafts identified as locations of ectodomain shedding mediated by Meltrin beta/ADAM19. *J Neurochem.* 89, 119-123.

Walker ES, Martinez M, Brunkan AL, Goate A.Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in A β 42/40 ratios. *J Neurochem.* 2005 Jan;92(2):294-301.

Wallum BJ, Taborsky GJ Jr, Porte D Jr, Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, Ward WK, Dorsa D.Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Jan;64(1):190-4.

Walsh,D.M. and Selkoe,D.J. (2007). A β oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 101, 1172-1184.

Wang,C., Sun,B., Zhou,Y., Grubb,A., and Gan,L. (2012). Cathepsin B degrades amyloid- β in mice expressing wild-type human amyloid precursor protein. *JBiol Chem.* 287, 39834-41.

Wang HX, Gustafson DR, Kivipelto M, Pedersen NL, Skoog I, Windblad B, Fratiglioni L. Education halves the risk of dementia due to apolipoprotein ϵ 4 allele: a collaborative study

from the Swedish brain power initiative. *Neurobiol Aging*. 2012 May;33(5):1007.e1-7. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.003. Epub 2011 Nov 5.

Wang,R., Meschia,J.F., Cotter,R.J., and Sisodia,S.S. (1991). Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *J Biol Chem*. 266, 16960-16964.

Wang,Y., Martinez-Vicente,M., Kruger,U., Kaushik,S., Wong,E., Mandelkow,E.M., Cuervo,A.M., and Mandelkow,E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet*. 18, 4153-4170.

Watanabe,N., Tomita,T., Sato,C., Kitamura,T., Morohashi,Y., and Iwatsubo,T. (2005). Pen-2 is incorporated into the gamma-secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1. *J Biol Chem*. 280, 41967-41975.

Webber,C.A., Hocking,J.C., Yong,V.W., Stange,C.L., and McFarlane,S. (2002). Metalloproteases and guidance of retinal axons in the developing visual system. *J Neurosci*. 22, 8091-8100.

Weidemann,A., Paliga,K., Durrwang,U., Reinhard,F.B., Schuckert,O., Evin,G., and Masters,C.L. (1999). Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases. *J Biol Chem*. 274, 5823-5829.

Weingarten,M.D., Lockwood,A.H., Hwo,S.Y., and Kirschner,M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 72, 1858-1862.

Weisgraber,K.H. and Mahley,R.W. (1996). Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J*. 10, 1485-1494.

Weisz,O.A. (2003). Acidification and protein traffic. *Int Rev Cytol*. 226:259-319., 259-319.

Wen,Y., Yang,S.H., Liu,R., Perez,E.J., Brun-Zinkernagel,A.M., Koulen,P., and Simpkins,J.W. (2007). Cdk5 is involved in NFT-like tauopathy induced by transient cerebral ischemia in female rats. *Biochim.Biophys.Acta*. 1772, 473-483.

Wewer,U.M., Morgelin,M., Holck,P., Jacobsen,J., Lydolph,M.C., Johnsen,A.H., Kveiborg,M., and Albrechtsen,R. (2006). ADAM12 is a four-leafed clover: the excised prodomain remains bound to the mature enzyme. *J Biol Chem*. 281, 9418-9422.

White,J.M. (2003). ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*. 15, 598-606.

Whitmer,R.A., Gustafson,D.R., Barrett-Connor,E., Haan,M.N., Gunderson,E.P., and Yaffe,K. (2008). Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology*. 71, 1057-1064.

Wolfe,M.S., Xia,W., Ostaszewski,B.L., Diehl,T.S., Kimberly,W.T., and Selkoe,D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*. 398, 513-517.

Wolfsberg,T.G., Primakoff,P., Myles,D.G., and White,J.M. (1995). ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol.* 131, 275-278.

Wu,J., Basha,M.R., Brock,B., Cox,D.P., Cardozo-Pelaez,F., McPherson,C.A., Harry,J., Rice,D.C., Maloney,B., Chen,D., Lahiri,D.K., and Zawia,N.H. (2008). Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *J Neurosci.* 28, 3-9.

- X - Y - Z -

Xu,Y., Kim,H.S., Joo,Y., Choi,Y., Chang,K.A., Park,C.H., Shin,K.Y., Kim,S., Cheon,Y.H., Baik,T.K., Kim,J.H., and Suh,Y.H. (2007). Intracellular domains of amyloid precursor-like protein 2 interact with CP2 transcription factor in the nucleus and induce glycogen synthase kinase-3beta expression. *Cell Death Differ.* 14, 79-91.

Yamazaki,T., Koo,E.H., and Selkoe,D.J. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci.* 109, 999-1008.

Yang,L.B., Lindholm,K., Yan,R., Citron,M., Xia,W., Yang,X.L., Beach,T., Sue,L., Wong,P., Price,D., Li,R., and Shen,Y. (2003). Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med.* 9, 3-4.

Yang,P., Baker,K.A., and Hagg,T. (2006). The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog.Neurobiol.* 79, 73-94.

Yang,P., Baker,K.A., and Hagg,T. (2005). A disintegrin and metalloprotease 21 (ADAM21) is associated with neurogenesis and axonal growth in developing and adult rodent CNS. *J Comp Neurol.* 490, 163-179.

Yarchoan M, Xie SX, Kling MA, Toledo JB, Wolk DA, Lee EB, Van Deerlin V, Lee VM, Trojanowski JQ, Arnold SE. Cerebrovascular atherosclerosis correlates with Alzheimer pathology in neurodegenerative dementias. *Brain.* 2012 Dec;135(Pt 12):3749-56. doi: 10.1093/brain/aws271.

Yen,W.L., Shintani,T., Nair,U., Cao,Y., Richardson,B.C., Li,Z., Hughson,F.M., Baba,M., and Klionsky,D.J. (2010). The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J Cell Biol.* 188, 101-114.

Yoshinaka,T., Nishii,K., Yamada,K., Sawada,H., Nishiwaki,E., Smith,K., Yoshino,K., Ishiguro,H., and Higashiyama,S. (2002). Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene.* 282, 227-236.

Zhang,C., Wu,B., Beglopoulos,V., Wines-Samuelson,M., Zhang,D., Dragatsis,I., Sudhof,T.C., and Shen,J. (2009). Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature.* 460, 632-636.

Zheng Z, Chen H, Ke G, Fan Y, Zou H, Sun X, Gu Q, Xu X, Ho PC. Protective effect of perindopril on diabetic retinopathy is associated with decreased vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio: involvement of a mitochondria-reactive oxygen species pathway. *Diabetes*. 2009 Apr;58(4):954-64. doi: 10.2337/db07-1524.

Zheng,L., Kagedal,K., Dehvari,N., Benedikz,E., Cowburn,R., Marcusson,J., and Terman,A. (2009). Oxidative stress induces macroautophagy of amyloid beta-protein and ensuing apoptosis. *Free Radic.Biol Med*. 46, 422-429.

Zirlinger,M., Kreiman,G., and Anderson,D.J. (2001). Amygdala-enriched genes identified by microarray technology are restricted to specific amygdaloid subnuclei. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 98, 5270-5275

- Autres références -

OMS, rapport du 11 avril 2012 de Genève

rapport de 2009 de Londres de l'association Alzheimer's Disease International

Alz.org

<http://library.med.utah.edu>

<http://www.alzheimer-montpellier.org>

www.molgen.ua.ac.be/ADMutations

[http://merops.Sanger .ac.uk/](http://merops.Sanger.ac.uk/)

BrainVISA, <http://brainvisa.info>

http://www.mouseimaging.ca/technologies/C57Bl6j_mouse_atlas.html

www.brain-map.org

www.molecularbrain.com

Annexe

- Résumé -

L'accumulation cérébrale progressive de peptides amyloïdes (A β) générés à partir du clivage du précurseur du peptide amyloïde (APP) par les sécrétases (β et γ) est un mécanisme central de la maladie d'Alzheimer. C'est pourquoi, améliorer la compréhension de la régulation et de l'homéostasie du métabolisme de l'APP est devenu primordial. Partant de ce constat, nous avons supposé qu'une partie de la réponse pourrait être apportée par la caractérisation de nouveaux acteurs du métabolisme de l'APP. De part leurs rôles cruciaux dans le cerveau (développement, plasticité et réparations) et dans le métabolisme de l'APP (α -sécrétases), les ADAMs sont des protéines d'intérêt dont certaines fonctions ou rôles restent à déterminer. Précédemment, par une approche transcriptomique ciblant la famille des ADAMs dans des cerveaux de patients et de contrôles, ADAM30 a été retrouvée sous-exprimée dans le cerveau des patients atteints de la pathologie. Dans deux modèles cellulaires nous avons constaté que la sous-expression d'ADAM30 entraînait une augmentation de tous les produits du métabolisme de l'APP comme chez les patients. Le résultat opposé a été obtenu lors de la sur-expression d'ADAM30 dans ces cellules.

Pour tenter de répliquer ces résultats dans un modèle plus proche de la physiopathologie humaine, nous avons développé un modèle de souris triples transgéniques surexprimant l'APP^{SweInd} et ADAM30 de manière conditionnelle. Dans ce modèle nous avons observé et mesuré une diminution des dépôts amyloïdes dans le cerveau des souris exprimant ADAM30. Dans un second temps puisqu'il avait été montré au laboratoire qu'ADAM30 ne module pas l'activité des sécrétases et ne clive pas directement l'APP, nous avons cherché à déterminer les substrats d'ADAM30 dans le cadre du métabolisme de l'APP. Par une approche systématique nous avons pu déterminer que la Cathepsine D (CTSD) et l'Insuline Receptor Substrat 4 (IRS4) sont deux substrats potentiels d'ADAM30. Dans nos modèles cellulaires et de souris, nous avons pu constater qu'ADAM30 est capable de cliver et d'activer la CTSD. L'activité de la CTSD semble nécessaire pour l'action d'ADAM30 sur le métabolisme de l'APP. Nous avons pu déterminer que l'action spécifique d'ADAM30 pour la CTSD est dépendante de la séquence d'adressage au lysosome située dans l'extrémité C-terminale de l'APP. Comme la CTSD est une protéine Lysosomale, ADAM30 pourrait favoriser spécifiquement l'activation de la CTSD augmentant ainsi la dégradation de l'APP au sein de la voie endosome/lysosome. Ce mécanisme limiterait l'entrée de l'APP dans son métabolisme et donc la production de peptides amyloïdes. Afin de mieux comprendre la spécificité d'action d'ADAM30 pour la CTSD et l'APP, nous avons commencé à travailler sur le rôle potentiel d'IRS4 et la relation entre la voie de signalisation de l'Insuline et le métabolisme de l'APP. Nos travaux nous ont donc permis de mettre en évidence un nouvel acteur du métabolisme de l'APP, ADAM30, intervenant dans la régulation et la dégradation de ce dernier et ainsi d'améliorer notre compréhension des mécanismes de régulations fins impliqués dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer.